

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 7 月 5 日 (05.07.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/48188 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 1/15, 1/19, 1/21,
5/10, C07K 14/705, 16/28, C12P 21/02, C12Q 1/02, 1/68,
A61K 31/711, 48/00, A61P 43/00, G01N 33/15, 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09408

(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 28 日 (28.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/375152
1999 年 12 月 28 日 (28.12.1999) JP
特願 2000/101339 2000 年 3 月 31 日 (31.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那 1532 番地 3
Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松本 俊一郎
(MATSUMOTO, Shun-ichiro) [JP/JP]; 〒273-0005 千葉
県船橋市本町 4-43-2-605 Chiba (JP). 小田 環 (ODA,

Tamaki) [JP/JP]; 〒292-0054 千葉県木更津市長須賀
392-203 Chiba (JP). 斎藤 洋子 (SAITO, Youko) [JP/JP];
〒292-0043 千葉県木更津市東太田 4-5-13-103 Chiba
(JP). 森川 記行 (MORIKAWA, Noriyuki) [JP/JP]; 〒292-
0833 千葉県木更津市貝渕 3-9-17-408 Chiba (JP). 吉田
賢二 (YOSHIDA, Kenji) [JP/JP]; 〒292-0043 千葉県木
更津市東太田 4-11-1-302 Chiba (JP). 諏訪 牧子 (SUWA,
Makiko) [JP/JP]; 〒144-0052 東京都大田区蒲田 1-24-4
Tokyo (JP). 杉山 友康 (SUGIYAMA, Tomoyasu) [JP/JP];
〒292-0045 千葉県木更津市清見台 2-6-23-102 Chiba
(JP). 岸本 利光 (KISHIMOTO, Toshimitsu) [JP/JP]. 神
崎 康治 (KANZAKI, Kouji) [JP/JP]. 保田 慎一郎 (YA-
SUDA, Shin-ichiro) [JP/JP]. 井上 佳久 (INOUE, Yoshi-
hisa) [JP/JP]; 〒573-1153 大阪府枚方市招提大谷 2-25-1
ウェルファイド株式会社 創業研究所内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
Ibaraki (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

[続葉有]

(54) Title: NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE-BINDING PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, GENES THEREOF AND PRODUCTION AND USE OF THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途

(57) Abstract: Nine novel genes sustaining hydrophobic domains, which are seemingly 7 transmembrane domains characteristic to G protein-coupled receptors, are successfully isolated by human tissue cDNA screening. These genes and proteins which are the expression products thereof are usable in screening ligands, screening agonists or antagonists which are useful as drugs, diagnosing diseases in which these gene participate, etc.

(57) 要約:

ヒト組織 cDNA のスクリーニングにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、さらにはこれら遺伝子が関連する疾患の診断などに利用し得る。



(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 *PCT* ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

- 1 -

明細書

新規なグアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体およびそれらの遺伝子、
並びにそれらの製造および用途

技術分野

本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

G 蛋白質共役型受容体(G protein-coupled receptors)は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体群の総称である。G 蛋白質共役型受容体は、分子内に細胞膜貫通領域を 7 回有する構造上の特性から、「7 回膜貫通型受容体」とも呼ばれる。G 蛋白質共役型受容体は様々な生理活性物質の情報を、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型 GTP 結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介する cAMP、フォスホオリパーゼ C を介する Ca^{2+} などがよく知られているが、三量体型 GTP 結合蛋白質を介したチャンネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (*Annu. Rev. Neurosci.* (97) 20:399)。G 蛋白質共役型受容体に対する基質 (リガンド) は、大変多岐に渡っており、タンパク性ホルモン、ケモカイン、ペプチド、アミン、脂質由来物質、さらにはトロンビンの様なプロテアーゼもその一例となる。現在、遺伝子が同定された G 蛋白質共役型受容体の数は感覚器受容体を除くと、ヒトで 300 個弱存在するが、リガンドが同定された G 蛋白質共役型受容体の数は、そのうち約 140 種類に過ぎず、リガン

- 2 -

ド未知な「オーファン G 蛋白質共役型受容体」が 100 種類以上存在している。しかしながら実際のヒトゲノム中には、少なくとも 400 種類、場合によっては 1000 種類もの G 蛋白質共役型受容体が存在する、とも想定されている (*Trends Pharmacol.Sci.* (97) 18:430)。この事は、今後のゲノム解析の飛躍的進展に伴って、機能未知なオーファン G 蛋白質共役型受容体の数も爆発的に増加する事を意味している。

これまでに世界の製薬企業により創られてきた薬剤は、その 9 割以上が細胞外空間での相互作用を標的としており、その中でも G 蛋白質共役型受容体に関連する低分子薬は大部分を占めている。その根拠としては、G 蛋白質共役型受容体に関連する疾患が、遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系など、非常に多くの領域に関連することにある。そのため、最近では多くの製薬企業がゲノム解析で明らかとなったオーファン G 蛋白質共役型受容体を所有し、リガンド探索と生理機能の解明に鎬を削っている。こうした状況を背景として、最近では新規 G 蛋白質共役型受容体の生理的リガンド探索の成功例も報告され始めている。例えば、calcitonin gene-related peptide 受容体 (*J.Biol.Chem.*(96) 271:11325)、orexin (*Cell* (98) 92:573)そして prolactin-releasing peptide (*Nature* (98) 393:272)などの事例は、生命科学分野での基礎研究としても大きな衝撃を持つ事例であった。

特に、オーファン G 蛋白質共役型受容体は新たな薬剤開発に繋がる可能性の高い標的として、多大な注目を集めている。一般的にオーファン G 蛋白質共役型受容体には特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーとハイスループットスクリーニングと組み合わせることで、オーファン G 蛋白質共役型受容体を標的とした薬剤の創製が提唱されている (*Trends Pharmacol.Sci.* (97) 18:430, *Br.J.Pharm.* (98) 125:1387)。すなわち、遺伝子操作によって同定されたオーファン G 蛋白質共役型受容体を、細胞内セカンドメッ

- 3 -

センサーである cAMP, Ca^{2+} の変化を指標とした機能スクリーニングにより生理的アゴニストを発見し、生体内機能解析を行うというものである。この際、化合物ライブラリーを利用して、スクリーニングをハイスループット化することにより、オーファン G 蛋白質共役型受容体に対する特異的な代替 (surrogate) アゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発も理論的には可能となる。

発明の開示

本発明は、このような G 蛋白質共役型受容体を取り巻く現状に鑑みてなされたものであり、その目的は新規な G 蛋白質共役型受容体およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することにある。さらにこれら分子を薬剤開発研究の標的として提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ヒト組織 cDNA を鋳型にしたポリメラーゼ連鎖反応を実施することにより、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持する 9 種類の新規遺伝子を単離することに成功した。これら遺伝子やその翻訳産物である蛋白質は、リガンドのスクリーニングや医薬品として有用なアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング、あるいはこれら遺伝子が関連する疾患の診断に利用し得る。

即ち、本発明は、新規な G 蛋白質共役型受容体およびそれらの遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

- 4 -

(b) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA、

(c) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA、

(d) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジントな条件下でハイブリダイズする DNA、

(2) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA、

(3) (1) または (2) に記載の DNA を含有するベクター、

(4) (1) または (2) に記載の DNA または (3) に記載のベクターを保持する形質転換体、

(5) (1) または (2) に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド、

(6) (4) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、(5) に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (5) に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (5) に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(8) (5) に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で (5) に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

- 5 -

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(9) (5) に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、(8) または (9) に記載の方法、

(11) (5) に記載の蛋白質に結合する抗体、

(12) (7) から (10) のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物、および

(13) (12) に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物、および

(14) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、(13) に記載の医薬組成物、

(15) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド、

(16) 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における (1) に記載の DNA の発現、または被検者における (1) に記載の DNA の変異を検出することを含む方法、

- 6 -

(17) (11)に記載の抗体または(15)に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬、を提供するものである。

なお、本発明において「G蛋白質共役型受容体」とは、GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜受容体を指す。

本発明において「リガンド」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達する生理的物質を指す。ここで「生理的物質」とは、生体内でG蛋白質共役型受容体に結合している化合物を指す。

本発明において「アゴニスト」とは、G蛋白質共役型受容体に結合し、細胞内にシグナルを伝達しうる化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明において「アンタゴニスト」とは、リガンドがG蛋白質共役型受容体に結合すること、もしくは細胞内にシグナルを伝達することを阻害する化合物を指し、生理的物質、人工的に合成した化合物、天然由来の化合物を含む。

本発明は、新規なG蛋白質共役型受容体および該蛋白質をコードするDNAを提供する。本発明に含まれる、本発明者等により単離された9のヒト由来のcDNAクローンを、「GPRv8」、「GPRv12」、「GPRv16」、「GPRv21」、「GPRv40」、「GPRv47」、「GPRv51」、「GPRv71」、「GPRv72」と命名した（必要に応じてこれらクローンをまとめて「GPRv」と称する）。これらcDNAの塩基配列を配列番号：5から8、22から26に、該cDNAによりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：1から4、17から21に示す。

BLAST検索の結果、GPRv cDNAがコードする蛋白質は、いずれも既知のG蛋白質共役型受容体と有意なアミノ酸配列上の相同性を示した。具体的には、「GPRv8」はHUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (P47901, 424aa)に対して36%の相同性を、「GPRv12」はRAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して27%の相同性を、「GPRv16」はMOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479

- 7 -

、348aa)に対して28%の相同性を、「GPRv21」はBOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して30%の相同性を、「GPRv40」はOXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して34%の相同性を、「GPRv47」はGPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して43%の相同性を、「GPRv51」はPROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して37%の相同性を、「GPRv71」はChicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa)に対して45%の相同性を、「GPRv72」はALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824, 466aa)に対して30%の相同性をそれぞれ示した。

また、本発明者等が単離したGPRv cDNA がコードする蛋白質（以下、「GPRv 蛋白質」と称することがある）は、いずれもG蛋白質共役型受容体の特徴である7個の膜貫通ドメインと考えられる疎水性領域を保持していた。これら事実から、GPRv cDNA は、いずれもG蛋白質共役型受容体ファミリーに属する蛋白質をコードしていると考えられる。G蛋白質共役型受容体は、そのリガンドの作用によりG蛋白質の活性化を通じて細胞内へシグナル伝達を行なう活性を有しており、上記したように遺伝的疾患を始めとして、脳神経系、循環器系、消化器系、免疫系、運動器系、泌尿器生殖器系などの非常に多くの領域の疾患に関連している。従って、GPRv 蛋白質は、GPRv 蛋白質の機能を調節するアゴニストやアンタゴニストなどのスクリーニングに利用することができ、上記疾患に対する医薬品の開発の重要な標的となる。

本発明は、また、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質がGPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。GPRv 蛋白質が持つ生物学的特性としては、三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内へシグナル伝達を行なう活性が挙げられる。三量体型GTP結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させるGq型、cAMPを上昇させるGs型、そしてcAMPを抑制するGi型の3種類のカテゴリーに分類される(*Trends Pharmacol.Sci.* (99) 20:118)。

- 8 -

従って、対象となる蛋白質が GPRv 蛋白質と同等の生物学的特性を有しているか否かは、例えば、その活性化による細胞内の cAMP 濃度もしくはカルシウム濃度の変化を検出することにより評価することが可能である。

GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の 1 つの態様としては、蛋白質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5)) が含まれる。また、蛋白質中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、GPRv 蛋白質のアミノ酸配列（配列番号：1 から 4、17 から 21）において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などにより変異した蛋白質であって、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。これら蛋白質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、GPRv 蛋白質の機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の 10% 以内であり、好ましくは全アミノ酸の 5% 以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の 1% 以内であると考えられる。

GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4)を利用して GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）またはその一部をもとに同種または異種生物由来の DNA 試料から、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることは、通常行いうることである。このように GPRv 蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA によりコードされる

蛋白質であって、GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。

このような蛋白質を単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのストリンジントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離される DNA がコードする蛋白質は、通常、GPRv 蛋白質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも 40%以上、好ましくは 60%以上、さらに好ましくは 80%以上（例えば、90%以上や 95%以上）の配列の相同性を指す。

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST(Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて

- 10 -

BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

また、遺伝子増幅技術 (PCR) (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4) を用いて GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号: 5 から 8、22 から 26) の一部を基にプライマーを設計し、GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列と相同性の高い DNA 断片を単離し、該 DNA を基に GPRv 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、リガンドに結合するがシグナル伝達を行なわないペプチドが含まれる。このようなペプチドを基に作製したアフィニティーカラムは、リガンドのスクリーニングに好適に用いることができる。また、本発明の蛋白質の部分ペプチドは、抗体作製に用いることも可能である。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。本発明の部分ペプチドは、通常、8 アミノ酸残基以上、好ましくは 12 アミノ酸残基以上 (例えば、15 アミノ酸残基以上) である。

本発明の蛋白質は、組換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組換え蛋白質は、例えば、後述するように本発明の蛋白質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現した蛋白質を精製することにより調製することが可能である。一方、天然の蛋白質は、例えば、後述する本発明の蛋白質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section

- 11 -

n 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション（例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) *NA R* 17:3129-3144」参照）などにより本発明の蛋白質を調製することも可能である。

また、本発明は、上記本発明の蛋白質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA としては、本発明の蛋白質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA など含まれる。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有する DNA が含まれる。本発明の DNA は、上記のように、GPRv 蛋白質をコードする DNA 配列（配列番号：5 から 8、22 から 26）あるいはその一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら DNA 配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、挿入した DNA を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター（Stratagene 社製）などが好ましい。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内で蛋白質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター（プロメガ社製）、大腸菌であれば pET ベクター（Invitrogen 社製）、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であれば pME18S ベクター（*Mol Cell Biol.* 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明の DNA の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりリガーゼ反応により行うことができる（*Current*

- 12 -

protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

また、本発明は、本発明の DNA または本発明のベクターを保持する形質転換体を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。蛋白質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞などを例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

また、本発明は、本発明の蛋白質をコードする DNA (配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖) に相補的な、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T (ただし RNA の場合は U)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明の DNA を検出、単離するためのプローブとして、また、本発明の DNA を増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは 15bp~35bp の鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明の DNA の少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも 15bp の鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明の蛋白質をコードする

- 13 -

DNA に特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジেন্টな条件下で、本発明の蛋白質をコードする DNA（配列番号：5 から 8、22 から 26）とハイブリダイズし、他の蛋白質をコードする DNA とはハイブリダイズしないことを意味する。

これらヌクレオチドは、本発明の蛋白質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、これらヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションや RT-PCR により、本発明の蛋白質をコードする DNA の発現異常を検査することができる。これらヌクレオチドは、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。また、これらヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により本発明の蛋白質をコードする DNA やその発現制御領域を増幅し、RFLP 解析、SSCP、シーケンシング等の方法により、DNA 配列の異常を検査・診断することができる。

また、これらヌクレオチドには、本発明の蛋白質の発現を抑制するためのアンチセンス DNA が含まれる。アンチセンス DNA は、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも 15bp 以上、好ましくは 100bp、さらに好ましくは 500bp 以上の鎖長を有し、通常、3000bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明の蛋白質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明の蛋白質をコードする DNA（例えば、配列番号：5 から 8、22 から 26）の配列情報を基にホスホロチオネート法（Stein, 1988 *Phy sicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res* 16, 3209-21 (1988)) などにより調製することが可能である。

本発明のヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウ

- 14 -

イルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、*ex vivo*法や *in vivo*法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

また、本発明は、本発明の蛋白質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従い本発明の蛋白質のアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成し、家兎に免疫することにより得ることが可能である (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12-11.13)。モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製した蛋白質を用いてマウスを免疫し、その脾臓細胞と骨髓腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞を調製し、該ハイブリドーマ細胞から得ることができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

本発明の蛋白質に結合する抗体は、本発明の蛋白質の精製に加え、例えば、本発明の蛋白質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などから蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明の蛋白質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。本発明の抗体は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の検査への利用が考えられる。

また、本発明の蛋白質に結合する抗体を、本発明の蛋白質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。本発明の抗体は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストとして作用し得る。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものと入れ換えたマウス（例えば、「Functional transp

lant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J. et al.(1997) *Nat.Genet.*15:146-156」参照)に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組換えによって調製することができる(*Methods in Enzymology* 203, 99-121(1991))。

また、本発明は、本発明の蛋白質を利用した、本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a)本発明の蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b)該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、種々のG蛋白質共役型受容体のリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド(例えば、ケミカルファイルに登録されているもの)あるいはファージ・ディスプレイ法(*J.Mol.Biol.* (1991) 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、本発明の蛋白質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ本発明の蛋白質に結合する化合物を精製する方法、ウエストウエスタンブロッティング法など多くの公知の方法を利用することができる。これら方法を利用する場合には、被検試料は適宜標識し、この標識を利用して本発明の蛋白質との結合を検出することができる。また、これら方法の他に、本発明の蛋白質を発現する細胞膜を調製して、これをチップ上に固定し

- 16 -

、リガンド結合時に三量体型 GTP 結合蛋白質が解離する事を、表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) の変化で検出する方法 (*Nature Biotechnology* (99) 17:1105) を用いることも可能である。

また、被検試料と本発明の蛋白質との結合活性は、被検試料が細胞表面に発現させた本発明の蛋白質へ結合することにより生じる細胞における変化を指標に検出することもできる。このような変化としては、例えば、細胞内の Ca^{2+} レベルの変化や cAMP レベルの変化が挙げられるが、これらに制限されない。具体的には、G 蛋白質共役型受容体に対するアゴニスト活性は GTP γ S 結合法により測定できる。

この方法の 1 つの実施例として、G 蛋白質共役型受容体を発現させた細胞膜を 20mM HEPES (pH7.4), 100mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 50 μM GDP 溶液中で、 ^{35}S で標識された GTP γ S 400pM と混合させ、被検試料存在下と非存在下でインキュベーション後、濾過 (filtration) を行い、結合した GTP γ S の放射活性を比較する手法を用いることができる。

また G 蛋白質共役型受容体は、三量体型 GTP 結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達するシステムを共有している。三量体型 GTP 結合蛋白質は、活性化する細胞内伝達系の種類によって、 Ca^{2+} を上昇させる Gq 型、cAMP を上昇させる Gs 型、そして cAMP を抑制する Gi 型の 3 種類に分類される。このことを応用して Gq 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、あるいは promiscuous な G α 蛋白質、G α 15、G α 16 を用いてリガンドスクリーニングの際の陽性シグナルを Gq の細胞内伝達経路である、 Ca^{2+} 上昇に帰結させることが可能である。上昇した Ca^{2+} レベルは、TRE (TPA responsive element) または MRE (multiple responsive element) を上流に有するレポーター遺伝子系、Fura-2、Fluo-3 などの染色指示薬そして蛍光蛋白 aequorin などの変化を指標として検出ができる。同様に、Gs 蛋白 α サブユニットと他の G 蛋白 α サブユニットとをキメラ化し、陽性シグナルを Gs の細胞内伝達経路である、cAMP

- 17 -

上昇に帰結させ、CRE(cAMP-responsive element)を上流に有するレポーター遺伝子系での変化を指標とすることも可能である (*Trends Pharmacol.Sci.* (99) 20:118)。

このスクリーニング系において本発明の蛋白質を発現させる宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられるが、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、HEK293 細胞などを例示することができる。本発明の蛋白質を脊椎動物細胞で発現させるためのベクターとしては、本発明の蛋白質をコードする遺伝子上流に位置するプロモーター、RNA のスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列や複製起点等を有するものを好適に用いることができる。例えば、SV40 の初期プロモーターを有する pSV2dhfr (*Mol.Cell.Biol.*(1981) 1,854-864) や、pEF-BOS (*Nucleic Acids Res.*(1990)18,5322)、pCDM8 (*Nature*(1987)329,840-842)、pCEP4 (Invitrogen 社) などは、G 蛋白質共役型受容体を発現させるのに有用なベクターである。ベクターへの本発明の DNA の挿入は常法により制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。また、宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL 社製)、FuGENE6 試薬 (ベーリンガー・マンハイム社)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法により、リガンドが単離されれば、本発明の蛋白質とリガンドの相互作用を阻害する化合物のスクリーニングが可能となる。従って、本発明は、また、本発明の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質また

- 18 -

はその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程(a)で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、特に制限はなく、例えば、コンビナトリアル・ケミストリー技術 (Tetrahedron (1995) 51, 8135-8137) によって得られた化合物群、あるいはファージ・ディスプレイ法 (*J.Mol.Biol.* (1991) 222, 301-310) などを用いて作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。

スクリーニングに用いる本発明の蛋白質は、例えば、細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、あるいはアフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。

具体的なスクリーニングの手法としては、例えば、リガンドを放射性同位元素などで標識して、被検試料の存在下において本発明の蛋白質と接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、本発明の蛋白質とリガンドとの結合活性を低下させる化合物を、該リガンドに付された標識を基に検出する方法を用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に、細胞内の変化を指標にスクリーニングすることも可能である。即ち、本発明の蛋白質を発現する細胞に被検試料の存在下でリガンドを接触させ、被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該細胞における変化を減少させる化合物を選択することにより、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同

- 19 -

様に調製することができる。このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補となる。

また、本発明は、本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法を提供する。このスクリーニング方法は、(a) 被検試料の存在下で本発明の蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、(b) 該リガンドの本発明の蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程(b)で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む。

被検試料としては、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法と同様に、コンビナトリアル・ケミストリー技術によって得られた化合物群、ファージ・ディスプレイ法などを応用して作成されたランダム・ペプチド群、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分、生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などを用いることができる。また、上記の本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。本発明の蛋白質を発現する細胞は、上記した本発明の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニングの場合と同様に調製することができる。被検試料接触後の細胞における変化は、上記のスクリーニング方法と同様に、細胞内の Ca^{2+} レベルや cAMP レベルの変化を指標に検出することができる。また、細胞内のシグナル伝達を検出する場合には、ルシフェラーゼなどをレポーター遺伝子とするレポーターアッセイ系等の測定系を利用して検出することも可能である。

この検出の結果、被検試料非存在下においてリガンドを接触させた場合の細胞における変化と比較して、被検試料を接触させた場合における細胞における変化が抑制されていれば、用いた被検試料は、本発明の蛋白質の活性を阻害する化合

- 20 -

物であると判定される。逆に、被検試料が該細胞における変化を増強させれば、該化合物は、本発明の蛋白質の活性を促進する化合物であると判定される。なお、ここでいう「本発明の蛋白質の活性の促進または阻害する」とは、本発明の蛋白質に対する直接的な作用であると、間接的な作用であるかを問わず、結果として本発明の蛋白質の活性が促進または阻害されることを指す。従って、このスクリーニングにより単離される化合物には、本発明の蛋白質またはリガンドに作用してこれらの結合を阻害または促進することにより本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物の他、これらの結合自体を阻害または促進しないが、結果として本発明の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物も含まれる。このような化合物には、例えば、本発明の蛋白質とリガンドとの結合を阻害しないが、細胞内のシグナル伝達経路を阻害若しくは促進する化合物が含まれる。

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の治療への応用が期待される。

- 2 1 -

本発明は、また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することを特徴とする、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法を提供する。

本実施例において、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病に関連した患部組織において、正常組織と比較して有意に発現レベルが相違することが見出された。従って、被検者のこれら組織における、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の発現を検出することにより、これら疾患の診断を行うことが可能である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳の双方が含まれる。

本発明の診断方法は、例えば、以下の如く実施することができる。

生検により採取した組織に一部や血液サンプルなどから、常法により RNA を抽出し、実施例で示した定量的 PCR、ノーザンハイブリダイゼーション、あるいはドットプロットハイブリダイゼーションなどにより GPRv mRNA の定量を行い、診断することが可能である。また、上記組織から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA 等の方法を用いた GPRv 蛋白質の定量、あるいは、非侵襲な方法として、GPRv 蛋白質に結合する化合物や抗体を標識したものを被検患者に投与し、PET（ポジトロンエミッショントモグラフィー）などでの検出により診断することも可能である。

この診断の結果、被検者由来の組織における遺伝子の発現が、上記疾患に罹患した患者由来の組織における遺伝子の発現と、同一の傾向（例えば、正常組織と比較した遺伝子の発現レベルの上昇または低下）を示せば、該被検者は、疾患に罹患している、または罹患のおそれがあると判定される。

例えば、GPRv8 は結腸で発現が認められるが、結腸癌でこの発現は顕著に上昇する。従って、被検者の結腸組織において、高レベルの GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は、結腸癌の疑いがある。また、正常の脾臓および子宮で発現が検出できなかったが、癌化で中程度発現した。従って、被検者の脾臓また

- 2 2 -

は子宮において、GPRv8 の発現が認められた場合、この被検者は膵臓癌または子宮癌の疑いがある。

GPRv12 は正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。また、アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。従って、被検者の卵巣または精巣において、GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、卵巣癌または精巣癌の疑いがある。同様に、被検者の海馬において、正常値より低レベルの GPRv12 の発現が認められた場合、この被検者は、アルツハイマー病の疑いがある。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の脳では海馬で発現が増強した。従って、被検者の結腸において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、脳において、正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv16 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv21 は、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなった。従って、被検者の結腸または精巣において正常値より低レベルの GPRv21 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加し、肝硬変により発現が減少した。従って、脳や精巣において正常値より高レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌や精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv40 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

- 23 -

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなった。従って、脳や腎臓において正常値より高レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は脳の癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv47 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。

GPRv51 は、結腸や精巣において癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。従って、結腸や精巣において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または精巣癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv51 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少し、肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。従って、結腸または腎臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌または腎臓癌の疑いがある。また、肝臓において正常値より低レベルの GPRv71 の発現が認められた場合、この被検者は肝硬変の疑いがある。また、前頭葉において正常値より低レベルの GPRv の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなった。アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。従って、結腸において正常値より低レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者は結腸癌の疑いがある。また、海馬において正常値より高レベルの GPRv72 の発現が認められた場合、この被検者はアルツハイマー病の疑いがある。

また、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異により、上記疾患が発症することもある。従って、本発明の GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の

- 24 -

変異を検出することにより、上記疾患の診断を行なうことも可能であると考えられる。

このような遺伝子診断は、例えば、以下の如く実施することができる。

診断用の核酸はゲノム DNA または cDNA を直接にあるいは PCR もしくはその他の増幅法を用いて増幅してもよい。正常遺伝子との比較において、増幅生成物のサイズ変化により欠失および挿入を検出することができる。増幅 DNA と GPRv をコードする DNA をハイブリダイズさせ融解温度の差などにより点突然変異を同定することができる。DNA 配列の相違は、変性物質含有または不含のゲル中の DNA フラグメントの電気泳動の移動度の変化を検出することや、直接的な DNA 塩基配列決定により検出できる。

この診断の結果、被検者における GPRv 蛋白質をコードする遺伝子が正常型と比較して変異していた場合、該被検者は上記疾患の疑いがあると判定される。

即ち、本明細書記載の方法により GPRv 蛋白質をコードする遺伝子の変異、mRNA や蛋白質の発現の増加や減少を検出することにより、癌、肝硬変、またはアルツハイマー病の診断方法またはかかる疾患に対する感受性の診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、「GPRv8」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR に対し 36%の相同性を示した。

図 2 は、「GPRv12」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR に対し 27%の相同性を示した。

図3は、「GPRv16」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 に対し 28%の相同性を示した。

図4は、「GPRv21」のアミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 に対して 30%の相同性を示した。

図5は、「GPRv40」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。OXYTOCIN RECEPTOR (P97926) に対して 34%の相同性を示した。

図6は、「GPRv47」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178) に対して 43%の相同性を示した。

図7は、「GPRv51」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749) に対して 37%の相同性を示した。

図8は、「GPRv71」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907) に対して 45%の相同性を示した。

図9は、「GPRv72」アミノ酸配列を「Query」にして、SWISS-PROT 全配列に対する BLAST 検索を行った結果を示す図である。ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824) に対して 30%の相同性を示した。

図10は、GPRv8 のハイドロパシープロットを示す図である。

図11は、GPRv8 と類似ファミリーとのアライメントを示す図である。

’*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

’:’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

- 26 -

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 1 2 は、図 1 1 の続きである。

図 1 3 は、GPRv12 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 1 4 は、GPRv12 と AF208288 のアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 1 5 は、GPRv16 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 1 6 は、GPRv16 の HMMPFAM、膜貫通領域および S-S 結合についてまとめた図である。

***はHMMPFAMの結果7tm_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@は S-S 結合を形成する Cys を示す。

図 1 7 は、GPRv21 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 1 8 は、GPRv21 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

'.' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

- 27 -

図 19 は、図 18 の続きである。

図 20 は、GPRv40 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 21 は、GPRv40 の HMMPFAM、膜貫通領域および S-S 結合についてまとめた図である。

***はHMMPFAMの結果7tm_1とアサインされた領域を示す。

###は膜貫通領域を示す。

@は S-S 結合を形成する Cys を示す。

図 22 は、GPRv47 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 23 は、GPRv47 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

',' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 24 は、図 23 の続きである。

図 25 は、図 24 の続きである。

図 26 は、GPRv51 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 27 は、GPRv51 と類似タンパクとのアラインメントを示す図である。

'*' はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

':' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

',' はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 28 は、GPRv71 のハイドロパシープロットを示す図である。

- 28 -

図 29 は、GPRv71 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

’*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

’:’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

’.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 30 は、図 29 の続きである。

図 31 は、GPRv72 のハイドロパシープロットを示す図である。

図 32 は、GPRv72 とその類似タンパクのアラインメントを示す図である。

’*’ はその位置で全ての配列で完全に保存されていることを意味する。

’:’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{STA},{NEQK},{NHQK},{NDBQ},{QHRK},{MILV},{MILF},{HY},{FYW}

’.’ はその位置で次のようなグループの内のいずれかが保存されている事を意味する。{CSA},{ATV},{SAG},{STNK},{STPA},{SGND},{SNDEQK},{NDEQHK},{NEQHRK}

図 33 は、図 32 の続きである。

図 34 は、図 33 の続きである。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法 (Maniatis, T. et al.(1982):"Molecular Cloning - A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

【実施例 1】 新規 G 蛋白質共役型受容体をコードする遺伝子の単離

- 29 -

本発明の新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72) をコードする全長 cDNA は、PCR により取得した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv8 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCCAGC CAACTTCACAGAGGGCAGCT-3' (配列番号: 9)、リバープライマーとして 5'-CTA GATGAATTCTGGCTTGGACAGAATC-3' (配列番号: 10) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94°C (2.5 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 5 に示す。

同配列は 1116 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 5 の第 1 番目から第 1116 番目) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (371 アミノ酸) を配列番号: 1 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv12 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGG CCCC GGCGAGGCGCTGCTGGCGG-3' (配列番号: 11)、リバープライマーとして 5'-TCAGTGTGTCTGCTGCAGGCAGGAATCA-3' (配列番号: 12) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い 5%ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返

- 30 -

した。その結果、約 1.1 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列は、ジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：6 に示す。

同配列は 1092 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：6 の第 1 番目から第 1092 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（363 アミノ酸）を配列番号：2 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv16 の増幅にはヒト脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGCTGGCAGCTGCCTTTGCAGACTCTAAC-3'（配列番号：13）、リバープライマーとして 5'-CTATTTAACACCTTCCCCTGTCTCTTGATC-3'（配列番号：14）を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造社) を用い、94°C (2 分) の後、94°C (30 秒) / 60°C (30 秒) / 72°C (1 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：7 に示す。

同配列は 1260 塩基のオープンリーディングフレーム（配列番号：7 の第 1 番目から第 1260 番目）を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列（419 アミノ酸）を配列番号：3 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

- 3 1 -

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv21 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGACCACCATGGGGTTCATGGATG-3' (配列番号: 15)、リバープライマーとして 5'-TTATTTTAGTCTGATGCAGTCCACCTCTTC-3' (配列番号: 16) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94°C (2.5 分) の後、94°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、94°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.2 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 8 に示す。

同配列は 1182 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 8) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (393 アミノ酸) を配列番号: 4 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv40 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGGATCTCTTTAGCCCCTCAATTC-3' (配列番号: 27)、リバープライマーとして 5'-CTAGAAGGCACTTTCGCAGGAGCAAGGC-3' (配列番号: 28) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、98°C (2.5 分) の後、98°C (5 秒) / 72°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 70°C (4 分) のサイクルを 5 回、98°C (5 秒) / 68°C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.3 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied

- 32 -

Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 22 に示す。

同配列は 1305 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 22) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (434 アミノ酸) を配列番号: 17 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv47 の増幅にはヒト胎児脳由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGA GTCCTCACCCATCCCCAGTCATC-3' (配列番号: 29)、リバープライマーとして 5'-TCATGACTCCAGCCGGGTGAGGCGGCAG-3' (配列番号: 30) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、5% ホルムアミド存在下で、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 72° C (1.5 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.4 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR 2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 23 に示す。

同配列は 1356 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 23) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (451 アミノ酸) を配列番号: 18 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv51 の増幅にはヒト精巣由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGAACC AGACTTTGAATAGCAGTGG-3' (配列番号: 31)、リバープライマーとして 5'-TC

- 3 3 -

AAGCCCCCATCTCATTGGTGCCACG-3' (配列番号：32) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、98° C (2.5 分) の後、98° C (30 秒) / 50° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 35 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：24 に示す。

同配列は 966 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号：24) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (321 アミノ酸) を配列番号：19 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv71 の増幅にはヒト胎児由来の Marathon Ready cDNA (Clontech 社) を鋳型 cDNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGGAGAAGGTGGACATGAATACATCAC-3' (配列番号：33)、リバープライマーとして 5'-TTACCCAGATCTGTTCAACCCTGGGCATC-3' (配列番号：34) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2.5 分) の後、98° C (5 秒) / 72° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 70° C (4 分) のサイクルを 5 回、98° C (5 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 25 回繰り返した。その結果、約 1.0 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号：25 に示す。

同配列は 1002 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号：25) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (333 アミノ酸) を配列番号：20 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体

- 34 -

の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

新規 G 蛋白質共役型受容体 GPRv72 の増幅にはヒトゲノム DNA (Clontech 社) を鋳型 DNA に、フォワードプライマーとして 5'-ATGACGTCCACCTGCACCAACAGCAGC C-3' (配列番号: 35)、リバープライマーとして 5'-TCAAGGAAAAGTAGCAGAAT CGTAGGAAG-3' (配列番号: 36) を用いた。PCR は Pyrobest DNA polymerase (宝酒造) を用い、94° C (2 分) の後、94° C (30 秒) / 55° C (30 秒) / 68° C (4 分) のサイクルを 30 回繰り返した。その結果、約 1.5 kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を pCR2.1 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。得られたクローンの塩基配列はジデオキシターミネーター法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列番号: 26 に示す。

同配列は 1527 塩基のオープンリーディングフレーム (配列番号: 26) を持っている。オープンリーディングフレームから予測されるアミノ酸配列 (508 アミノ酸) を配列番号: 21 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型受容体の特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型受容体をコードすることが判明した。

〔実施例 2〕 新規 G 蛋白質共役型受容体のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索

「GPRv8」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 1 に示した。「GPRv8」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では HUMAN VASOPRESSIN V1 B RECEPTOR (P47901, 424aa) に対して、36% で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv8」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv12」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 2 に示した。「GPRv12」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では RAT 5-HYDROXYTRYPTA

MINE 6 RECEPTOR (P31388, 436aa)に対して、27%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv12」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv16」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 3 に示した。「GPRv16」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (P56479, 348aa)に対して、28%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv16」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv21」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 4 に示した。「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では「GPRv21」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (P79113, 384aa)に対して 30%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv21」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv40」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 5 に示した。「GPRv40」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、OXYTOCIN RECEPTOR (P97926, 388aa)に対して 34%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv40」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv47」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 6 に示した。「GPRv47」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (Q91178, 428aa)に対して 43%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv47」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv51」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 7 に示した。「GPRv51」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA (P23749, 343aa)に対して 37%で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv51」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

- 36 -

「GPRv71」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 8 に示した。「GPRv71」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、Chicken P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (Q98907, 328aa) に対して 45% で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv71」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

「GPRv72」のアミノ酸配列での SWISS-PROT に対する BLAST 検索結果を図 9 に示した。「GPRv72」は既知 G 蛋白質共役型受容体の中では同一なものは存在せず、ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (002824, 466aa) に対して 30% で最も高い相同性を示した。このことから「GPRv72」が新規 G 蛋白質共役型受容体であることが判明した。

【実施例 3】 発現組織解析

1. 試薬

1.1 定量用 polymerase chain reaction (PCR) プライマー及び TaqMan プローブ：センスプライマー、アンチセンスプライマー、及び TaqMan プローブは PE Biosystems の遺伝子解析ソフトウェア Primer Express version 1.0 を用いて設計した。通常のプライマーはアマシャム・ファルマシア・バイオテク（東京）に、TaqMan プローブは PE Biosystems Japan に製造を依頼した。なお、TaqMan プローブは、5' 端にはリポーター色素 FAM を、3' 端にはクエンチャー tamra を結合させた。プライマー及び TaqMan プローブの塩基配列を下に示す。

GPRv8 用合成 DNA

PCR プライマー G8.957F : CCAGGAGCGTTTCTATGCCT (配列番号 : 37)

G8.1082R : TGTGATCTTTGCTCCCTGCA (配列番号 : 38)

TaqMan プローブ GPRv8.987T : TCAGAACCTGCCAGCATTGAATAGTGCC (配列番号 : 39)

GPRv12 用合成 DNA

PCR プライマー G12.794F : ATCTGCTTTGCCCCGTATGT (配列番号 : 40)

- 3 7 -

G12.903R : ACCGCCTTGCTGTAGGTCAG (配列番号 : 4 1)

TaqMan プローブ GPRv12.834T:TCGTGCCCTTCGTCACCGTGAA (配列番号 : 4 2)

GPRv16 用合成 DNA

PCR プライマー G16.1133F : CCCAGCATCCATACCAGAAAA (配列番号 : 4 3)

G16.1254R : CTGTGTCCCTCTCATGCCAAA (配列番号 : 4 4)

TaqMan プローブ GPRv16.1193T: TGAGAAGGCAGAGATTCCCATCCTTCCT (配列番号 : 4 5)

GPRv21 用合成 DNA

PCR プライマー G21.989F : TCGCCATGAGCAACAGCAT (配列番号 : 4 6)

G21.1114R : CACTGGACTTACCGCCATTGT (配列番号 : 4 7)

TaqMan プローブ GPRv21.1064T: AGATCATGTTGCTCCACTGGAAGGCTTCT (配列番号 : 4 8)

GPRv40 用合成 DNA

PCR プライマー G40.16F : GGATCTCTTTAGCCCCTCAATTC (配列番号 : 4 9)

G40.99R : AAGGTCAGGTTGAGACCCAG (配列番号 : 5 0)

TaqMan プローブ GPRv40.53T: AACATTTCCGTGCCCATCTTGCTGG (配列番号 : 5 1)

GPRv47 用合成 DNA

PCR プライマー G47.1292F : GCTGTTGACTTTCGAATCCCA (配列番号 : 5 2)

G47.1393R : ACGGAGGTAGCTGTCTGACATGA (配列番号 : 5 3)

TaqMan プローブ GPRv47.1336T: TGAGTTCCTGGAGCAGCAACTCACCA (配列番号 : 5 4)

GPRv51 用合成 DNA

PCR プライマー G51.190F : GGCTTTCGAATGCACAGGAA (配列番号 : 5 5)

G51.276R : GGAAGCCATGCTGAAGAGGA (配列番号 : 5 6)

TaqMan プローブ GPRv51.214T: TTCTGCATCTATATCCTCAACCTGGCGG (配列番号 : 5 7)

- 3 8 -

GPRv71 用合成 DNA

PCR プライマー G71.746F : TGGCCTCTTCACCCTCTGTTT (配列番号 : 5 8)

G71.841R : ATCAAGAGCTGGCAGTCCTGA (配列番号 : 5 9)

TaqMan プローブ GPRv71.775T:TCCATATCACTCGCTCCTTCTACCTCACCA (配列番号 : 6 0)

GPRv72 用合成 DNA

PCR プライマー G72.101F : CCAAATGCCCATCAGCCT (配列番号 : 6 1)

G72.190R : GCACTATGTTGCCGACGAAA (配列番号 : 6 2)

TaqMan プローブ GPRv72.132T:CATCCGCTCAACCGTGCTGGTTATCT (配列番号 : 6 3)

1.2 疾患由来 cDNA

同一患者の腫瘍および正常組織由来の cDNA は、Clontech の Matched cDNA Pairs を用いた。組織は肺、胃、結腸、卵巣、前立腺、子宮、および腎臓である。

腫瘍患者および正常成人の脳、脾臓、精巣、肝硬変患者および正常成人の肝臓、ループス病患者の腎臓、アルツハイマー病 (AD) 患者および正常成人の海馬及び前頭葉に由来する cDNA は、BioChain Institute から購入して用いた。

1.3 定量 PCR 反应用試薬 :

TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Biosystems) を使用した。内部標準測定用として TaqMan β -actin Control Reagents (PE Biosystems) を用いた。

2. 定量 PCR 反応 :

1) 鋳型 cDNA の希釈

BioChain の cDNA は水にて 50 倍希釈し、Clontech の cDNA は水にて 5 倍希釈して用いた。

2) マスターミックスの調製

以下の組成の反応溶液を調製した。

- 39 -

	反応容量	調製容量
2×Master Mix	12.5 μ l	1380 μ l
センスプライマー (50 μ M)	0.5 μ l	55.2 μ l
アンチセンスプライマー (50 μ M)	0.5 μ l	55.2 μ l
TaqMan Probe (5 μ M)	1 μ l	110.4 μ l
鋳型 cDNA	2.5 μ l	
精製水	8 μ l	883.2 μ l
総量	25 μ l	2484 μ l

3) PCR 反応溶液の作成

マスターミックス溶液 54 μ l に鋳型 cDNA を 6 μ l 加えた後、定量 PCR 装置用の PCR プレートに 25 μ l ずつ duplicate でサンプル用ウェルに分注した。Non template control 用の 2 ウェルには上記マスターミックスを 25 μ l ずつ分注した。標準曲線の作成には pCEP4 ベクターにサブクローニングした cDNA を 100pg/ μ l から始めて 1/10 ずつ 8 段階希釈したものを利用した。2) のマスターミックス 54 μ l と Standard 液 6 μ l を加えたものから、25 μ l ずつを Standard 用ウェルに分注した。即ち、Standard 用ウェルには最も高濃度のもので 250pg、低濃度で 25ag (a: atto, 10^{-18}) のプラスミド DNA が入ることになる。8 連のキャップを装着した後、軽く遠心し気泡を除いた。

4) PCR 反応

プレートを定量 PCR 装置 (GeneAmp 5700 Sequence Detection System: PE Biosystems) にセットし、以下の運転プログラムで反応させた。

- ① 50°C, 2 分 : 1 サイクル
- ② 95°C, 10 分 : 1 サイクル
- ③ 95°C, 15 秒 } : 50 サイクル
- 60°C, 1 分 }

5) 定量解析

- 4 0 -

GeneAmp 5700 の操作マニュアルに従い、定量解析を行い出力した。

3. 結果およびまとめ：

ヒト正常および疾患患者の臓器由来 cDNA を用いた GPCR の発現プロファイルは、アクチン遺伝子の発現量を内部標準として相対的な比を求め、2 回の実験の平均を表 1 にまとめた。

- 4 1 -

表 1

	relative copy number								
	GPRv8	GPRv12	GPRv16	GPRv21	GPRv40	GPRv47	GPRv51	GPRv71	GPRv72
Brain Normal ¹⁾	0	0	1	0	6	9	0	0	0
Brain Tumor ¹⁾	5	2	11	0	23	76	2	5	0
Lung Normal	0	0	1	0	11	0	1	1	0
Lung Tumor	1	0	1	0	11	2	1	1	1
Stomach Normal	6	0	0	0	29	0	1	1	0
Stomach Tumor	3	0	2	0	1	0	3	0	1
Pancreas Normal ¹⁾	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Pancreas Tumor ¹⁾	45	2	0	0	23	2	3	4	1
Colon Normal	141	0	61	11	119	50	111	44	113
Colon Tumor	2766	0	0	0	110	21	6	2	0
Ovary Normal	0	0	1	0	2	1	2	1	1
Ovary Tumor	0	4	0	0	21	1	3	3	0
Uterus Normal	0	0	3	0	7	0	3	3	1
Uterus Tumor	19	0	0	0	9	1	21	8	1
Prostate Normal	0	0	0	0	18	1	3	1	0
Prostate Tumor	6	0	0	0	9	0	8	3	0
Testis Normal ¹⁾	18	0	10	5	3	22	20	2	1
Testis Tumor ¹⁾	8	3	13	0	21	3	3	2	0
Kidney Normal	9	0	0	0	29	0	27	3	5
Kidney Tumor	9	0	0	0	28	10	15	0	0
Kidney Lupus ¹⁾	25	0	1	0	1	0	3	1	0
Liver Normal ¹⁾	0	0	10	0	27	11	13	5	1
Liver Cirrhosis ¹⁾	1	0	0	0	4	0	2	0	0
Hippocampus Normal ¹⁾	6	12	4	0	40	113	2	5	2
Hippocampus AD ¹⁾	16	1	50	3	111	63	55	12	27
Frontal lobe Normal ¹⁾	3	2	8	0	16	140	3	8	1
Frontal lobe AD ¹⁾	2	1	1	0	9	29	2	2	0

3倍以上の発現変化が再現された場合、有意と考える。¹⁾ 印のある臓器由来 cDNA は BioChain から購入したものであり、印のない臓器由来 cDNA は Clontech から購入したものである。以下に、個々の遺伝子の疾患による発現変化をまとめる。

GPRv8 は正常の脾臓および子宮では発現が検出できなかったが、癌化で中等度発現した。結腸で強く発現するが、結腸癌でさらに強力に発現した。

GPRv12 は全体的に発現が弱かった。正常卵巣および精巣では発現が検出できなかったが、癌化で発現が検出できた。アルツハイマー病では海馬での発現が減少した。

GPRv16 は、結腸で発現しているが、癌化で発現が検出できなくなった。脳では癌化で発現が増加した。肝臓では肝硬変により発現が検出できなくなった。アルツハイマー病脳では海馬で発現が増強した。

- 4 2 -

GPRv21 は、発現は少ないが、癌化により結腸及び精巣での発現が検出できなくなった。

GPRv40 は、癌化により脳、精巣での発現が増加した。肝硬変により発現が減少した。

GPRv47 は、癌化により脳、腎臓での発現が増加し、精巣での発現が減少した。肝臓での発現が肝硬変で検出できなくなった。

GPRv51 は、結腸で強く発現しているが癌化により発現が減弱した。精巣では癌化により発現が減少した。肝硬変の肝臓でも正常と比較して発現が減少した。脳では発現が弱い、アルツハイマー病において海馬で発現が増大した。

GPRv71 は、癌化により結腸および腎臓での発現が減少した。肝硬変の肝臓では発現が検出できなくなった。アルツハイマー病では前頭葉での発現が減少した。

GPRv72 は、結腸では強く発現しているが癌化で発現が検出できなくなった。脳では発現が弱い、アルツハイマー病の海馬で発現が増大した。

【実施例 4】 バイオインフォマティクスによる GPRv8 の解析

1. GPRv8 のホモロジー検索

GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv8 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv8 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-39 未満のもの) を表 2 に示す。

- 43 -

表 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AE003754	2e-68	43	gene: "CG6111" - <i>Drosophila melanogaster</i>
AF147743	7e-43	33	vasotocin VT1 receptor - <i>Gallus gallus</i>
AF184966	2e-42	33	arginine vasotocin receptor - <i>Platichthys flesus</i>
X93313	4e-42	36	mesotocin receptor - giant toad
X76321	8e-42	32	vasotocin receptor - white sucker
X87783	4e-41	33	isotocin receptor - white sucker
X64878	3e-40	32	oxytocin receptor - <i>H.sapiens</i>
U82440	7e-40	32	oxytocin receptor - <i>Macaca mulatta</i>

2. 膜貫通部位の予測

GPRv8 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv8 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した (図 10)。

3. HMMPfam 検索

GPRv8 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv8 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 3 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 4 4 -

表 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	164.2	5.1e-51	66	330	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit : 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv8と表2のタンパクのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図11、12)。GPRv8は7個の膜貫通部位(###)を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys(@をつけたCys)を有することが判明した。

[実施例5] バイオインフォマティクスによる GPRv12 の解析

1. GPRv12 のホモロジー検索

GPRv12のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表4に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv12はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv12のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-15未満のもの)を表4に示す。

- 4 5 -

表 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF208288	8e-88	50	orphan G protein-coupled receptor GPR26 - Rattus norvegicus
L03202	2e-17	24	5-hydroxytryptamine receptor - rat
L41146	5e-17	23	5-HT6 serotonin receptor - Rattus norvegicus
S62043	2e-16	25	serotonin receptor 6 - rat
L41147	2e-16	24	5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens
AF134158	4e-16	23	serotonin 6 receptor - Mus musculus
L14856	4e-16	26	somatostatin receptor 4 - Human
Y14627	5e-16	21	Dopamine receptor - Cyprinus carpio
L07833	6e-16	26	somatostatin receptor 4 - Homo sapiens
AF069547	8e-16	21	putative odorant receptor LOR4 - Lampetra fluviatilis

2. 膜貫通部位の予測

GPRv12 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J. Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (TM1~TM7) を有することが判明した(図 1 3)。

3. HMMPfam 検索

GPRv12 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv12 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 5 に HMMPfam 検索の結果を示す。

- 46 -

表 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	74.7	7.7e-23	22	294	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit： 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score： この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expept： この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from： 推定されたドメインの開始位置

Q to： 推定されたドメインの終了位置

Description： 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv12 と orphan G protein-coupled receptor GPR26 - *Rattus norvegicus* (AF208288) とのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 14)。GPRv12 は 7 個の膜貫通部位 (### ###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 6] バイオインフォマティクスによる GPRv16 の解析

1. GPRv16 のホモロジー検索

GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 6 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv16 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv16 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e⁻¹⁸ 未満のもの) を表 6 に示す。

- 47 -

表 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF042784	4e-20	23	GALANIN RECEPTOR TYPE 2 - Mus musculus
U30290	4e-20	27	galanin receptor GALR1 - Rattus norvegicus
U90657	6e-20	27	GALANIN RECEPTOR TYPE 1 - mouse
AF042782	7e-20	25	galanin receptor type 2 - Homo sapiens
U94322	1e-19	24	galanin receptor type2 - Rattus norvegicus
AF077375	6e-19	23	galanin receptor type2 - Mus musculus

2. 膜貫通部位の予測

GPRv16 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J. Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv16 は 7 個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図 15)。

3. HMMPfam 検索

GPRv16 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv16 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 7 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 48 -

表 7

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	23.8	8.3e-7	155	306	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	13.3	0.0017	53	133	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 16 にまとめた。GPRv16 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (@) を有することが判明した。

[実施例 7] バイオインフォーマティクスによる GPRv21 の解析

1. GPRv21 のホモロジー検索

GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 8 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv21 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv21 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e^{-35} 未満のもの) を表 8 に示す。

- 49 -

表 8

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AL121755	0.0	89	G-protein coupled receptor - Human
AF236082	0.0	83	G-protein coupled receptor GPR73 - Mus musculus
M81490	9e-37	34	neuropeptide receptor - D.melanogaster
U50144	3e-36	30	type 2 neuropeptide Y receptor - Bos taurus
U42766	6e-36	29	neuropeptide y2 receptor - Human
AF037444	8e-36	28	cardioexcitatory receptor - Lymnaea stagnalis
D86238	8e-36	28	neuropeptideY-Y2 receptor - Mus musculus
U42389	8e-36	29	neuropeptide y/peptide YY receptor type 2 - human
U76254	8e-36	29	neuropeptide Y receptor type 2 - Human

2. 膜貫通部位の予測

GPRv21 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv21 は7個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図17)。

3. HMMPfam 検索

GPRv21 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmerr.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv21 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 9 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 50 -

表 9

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	188.1	1.6e-58	79	338	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit： 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score： この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expekt： この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from： 推定されたドメインの開始位置

Q to： 推定されたドメインの終了位置

Description： 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7 を用いて GPRv21 と表 8 のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった (図 18、19)。GPRv8 は 7 個の膜貫通部位 (### ###) を有し、GPCR に特有の SS 結合を行うと考えられる Cys (@をつけた Cys) を有することが判明した。

[実施例 8] バイオインフォマティクスによる GPRv40 の解析

1. GPRv40 のホモロジー検索

GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列 (既知配列データベースとは、EMBL (Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK (Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である) に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.) を用いて検索したところ、表 10 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv40 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv40 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 10 に示す。

- 5 1 -

表 1 0

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D86599	1e-13	23	oxytocin receptor - Mus sp.
U15280	4e-13	23	oxytocin receptor - Rattus norvegicus
X76321	1e-12	22	vasotocin receptor - white sucke r
X64878	2e-12	21	oxytocin receptor - H.sapiens
X87783	2e-12	21	isotocin receptor - C.commersoni
D45400	3e-12	23	vasopressin receptor V1b - rat
L37112	3e-12	24	vasopressin receptor subtype 1b - Homo sapiens
U27322	6e-12	23	arginine-vasopressin V1b recepto r - Rattus norvegicus
U82440	6e-12	21	oxytocin receptor - Macaca mulatta

2. 膜貫通部位の予測

GPRv40 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv40 は7個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図20)。

3. HMMPfam 検索

GPRv40 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv40 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 1 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 5 2 -

表 1 1

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	26.5	1.1e-07	228	352	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	18.1	5e-05	59	181	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expekt: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4.

3. と 4. の結果を図 2 1 にまとめた。GPRv40 は GPCR に特徴的な S-S 結合を形成する Cys (@) を有することが判明した。

【実施例 9】 バイオインフォーマティクスによる GPRv47 の解析

1. GPRv47 のホモロジー検索

GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>) である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表 1 2 に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv47 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv47 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-11 未満のもの) を表 1 2 に示す。

- 5 3 -

表 1 2

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
D43633	1e-85	41	G protein-coupled seven-transmembrane receptor - Medaka fish
X98133	2e-28	27	histamine H2 receptor - H.sapiens
M32701	3e-28	28	histamine H2 receptor - Canine histamine
L41147	6e-28	31	5-HT6 serotonin receptor - Homo sapiens
U25440	8e-28	26	histamine H2 receptor - Cavia porcellus
D49783	1e-27	28	histamine H2 receptor - Human
U64032	2e-27	27	alpha 1d adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S73473	3e-27	28	beta 3-adrenergic receptor - rats
M74716	4e-27	28	beta-adrenergic receptor - Rat
S57565	6e-27	27	histamine H2-receptor - rats

2. 膜貫通部位の予測

GPRv47 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv47 は 7 個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図 2 2)。

3. HMMPfam 検索

GPRv47 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322))を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmerr.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>)を用いて検索した。

その結果、GPRv47 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 3 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 54 -

表 1 3

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	137.9	9.6e-43	59	341	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw 1.7を用いてGPRv47と類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図23~25)。GPRv8は7個の膜貫通部位(###)を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys(@をつけたCys)を有することが判明した。

[実施例10] バイオインフォマティクスによるGPRv51の解析

1. GPRv51のホモロジー検索

GPRv51のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al.(1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表14に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv51はGPCRと相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv51のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueがe-18未満のもの)を表14に示す。

- 5 5 -

表 1 4

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
M35297	4e-43	36	G-protein coupled receptor - Rat
J03823	1e-42	34	Rat mas oncogene, complete cds.
M13150	3e-40	34	mas proto-oncogene - Human
X67735	1e-39	35	Mas proto-oncogene - M.musculus mas
AL035542	1e-35	36	MAS-related G protein-coupled recep tor MRG - Human

2. 膜貫通部位の予測

GPRv51 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv51 は 7 個の膜貫通部位(TM1~TM7) を有することが判明した(図 2 6)。

3. HMMPfam 検索

GPRv51 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1): 320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv51 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。表 1 5 に HMMPfam 検索の結果を示す。

表 1 5

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	32.6	1.4e-09	44	78	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)
7tm_1	30.1	8.7e-09	104	276	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

- 5 6 -

Score : この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expext : この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from : 推定されたドメインの開始位置

Q to : 推定されたドメインの終了位置

Description : 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv51とG-protein coupled receptor - Rat(M35297)と
のアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図27)。GPRv51は7個の膜貫
通部位(###)を有することが判明した。

[実施例11] バイオインフォマティクスによるGPRv71の解析

1. GPRv71のホモロジー検索

GPRv71のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release
64, <http://www.ebi.ac.uk/>), GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)
である)に対して解析プログラム(BLAST2.0)(Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表16に
示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv71はGPCRと相同性を
有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv71のアミノ酸配列を既
知配列に対して解析プログラム(blast2.0)を用いて検索した結果(E-valueが
e-35未満のもの)を表16に示す。

- 57 -

表 1 6

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF069555	9e-44	44	G protein-coupled receptor p2y3 - Meleagris gallopavo
X98283	9e-44	45	P2Y PURINOCEPTOR 3 - G.domesticus
AF031897	6e-41	40	P2Y nucleotide receptor - Meleagris gallopavo
X99953	1e-39	41	P2Y PURINOCEPTOR 8 - X.laevis
D63665	2e-37	41	novel G protein-coupled P2 receptor - Rat
Y14705	1e-36	40	P2Y4 receptor gene - Rattus norvegicus
AJ277752	2e-36	41	P2Y4 receptor - Mus musculus

2. 膜貫通部位の予測

GPRv71 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv71 は 7 個の膜貫通部位(TM1~TM7) を有することが判明した(図 2 8)。

3. HMMPfam 検索

GPRv71 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索(HMMPFAM(Sonnhammer EL,et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322))を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmmer.wustl.edu/>)、PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv71 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。

表 1 7 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

- 58 -

表 17

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	90.6	7.6e-28	40	161	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expekt: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv71とその類似タンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図29、30)。GPRv71は7個の膜貫通部位(###)を有することが判明した。

[実施例12] バイオインフォマティクスによるGPRv72の解析

1. GPRv72 のホモロジー検索

GPRv72 のアミノ酸配列を既知配列(既知配列データベースとは、EMBL(Release 64, <http://www.ebi.ac.uk/>)、GENBANK(Release 120.0, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、PIR (Release 66.00, <http://www-nbrf.georgetown.edu/pir/>)である)に対して解析プログラム (BLAST2.0) (Altschul, Stephen F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.)を用いて検索したところ、表18に示す配列とホモロジーを有することが明らかになった。GPRv72 は GPCR と相同性を有する、新規なクローンであることが判明した。GPRv72 のアミノ酸配列を既知配列に対して解析プログラム (blast2.0) を用いて検索した結果 (E-value が e-24 未満のもの) を表18に示す。

- 59 -

表 18

Hit (ID)	E-value	Identities %	Description
AF091890	4e-29	32	G-protein coupled receptor RE2 - Homo sapiens
U81982	3e-25	30	alpha 1a-adrenoceptor - Oryctolagus cuniculus
S71323	6e-25	32	alpha-1A adrenergic receptor - Japanese medaka
D63859	6e-25	32	alpha1A-adrenoceptor - Oryzias latipes
U07126	8e-25	29	alpha1c adrenergic receptor - Rattus norvegicus
U03866	8e-25	30	adrenergic alpha-1c receptor protein - Human
AF013261	8e-25	30	alpha 1A adrenergic receptor isoform 4 - Homo sapiens
L31774	8e-25	30	alpha-1C-adrenergic receptor - Human
D32202	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 2 - Human
D32201	8e-25	30	alpha 1C adrenergic receptor isoform 3 - Human
D25235	8e-25	30	alpha1C adrenergic receptor

2. 膜貫通部位の予測

GPRv72 のアミノ酸配列を用いて Kyte-Doolittle の方法(J.Kyte and R.F.Doolittle, (1982), *J.Mol.Biol.*, 157,105-132.)によりハイドロパシープロットを作成し、膜貫通部位の予測を行った。その結果、GPRv72 は 7 個の膜貫通部位(TM1~TM7)を有することが判明した(図 3 1)。

3. HMMPfam 検索

GPRv72 のアミノ酸配列をクエリーとし、隠れマルコフモデルを用いた PFAM 検索 (HMMPFAM(Sonnhammer EL, et al., *Nucleic Acids Res* 1998 Jan 1;26(1):320-322)) を行った。隠れマルコフモデルは HMMER version2.1(<http://hmm.>

- 60 -

wustl.edu/), PFAM データベースは Pfam Version 5.5 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>) を用いて検索した。

その結果、GPRv72 は、tm7_1 (Rhodopsin family) を有することが判明した。
表 19 に、HMMPfam 検索の結果を示す。

表 19

Hit	Score	Expect	Q from	Q to	Description
7tm_1	196.1	4.7e-61	48	454	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)

Hit: 検索の結果推定されるドメインの名前。

Score: この値が高ければ高いほど信頼度が高い。

Expect: この値が 0 に近ければ近いほど信頼度が高い。

Q from: 推定されたドメインの開始位置

Q to: 推定されたドメインの終了位置

Description: 推定されたドメインの説明

4. アミノ酸配列のアライメント

Clustalw1.7を用いてGPRv72と表18のタンパクとのアミノ酸配列のアライメントをおこなった(図32~34)。GPRv72は7個の膜貫通部位(###)を有し、GPCRに特有のSS結合を行うと考えられるCys(@をつけたCys)を有することが判明した。

産業上の利用の可能性

本発明により、新規 G 蛋白質共役型受容体 (GPRv8, GPRv12, GPRv16, GPRv21, GPRv40, GPRv47, GPRv51, GPRv71, GPRv72)、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該蛋白質の製造方法が提供された。さらに、該蛋白質の活性を修飾する化合物のスクリーニング方法が提供された。本発明の蛋白質やその遺伝子、または本発明の蛋白質の活性を修飾

- 6 1 -

する化合物は、本発明の G 蛋白質共役型受容体蛋白質が関与する疾患の新しい
予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。

- 6 2 -

請求の範囲

1. グアノシン三リン酸結合蛋白質共役型の受容体をコードする下記 (a) から (d) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：5 から 8、22 から 26 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

2. 配列番号：1 から 4、17 から 21 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。

3. 請求項 1 または 2 に記載の DNA を含有するベクター。

4. 請求項 1 または 2 に記載の DNA または請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。

5. 請求項 1 または 2 に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。

6. 請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させた蛋白質またはペプチドを回収する工程を含む、請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。

7. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 5 に記載の蛋白質またはペプチドに被検試料を接触させる工程、

- 6 3 -

(b) 該蛋白質またはペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

8. 請求項 5 に記載の蛋白質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で請求項 5 に記載の蛋白質またはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該蛋白質またはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 被検試料非存在下での結合活性と比較して、工程 (a) で検出された結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

9. 請求項 5 に記載の蛋白質の活性を阻害または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下で該蛋白質を発現する細胞に該蛋白質のリガンドを接触させる工程、

(b) 該リガンドの該蛋白質への結合による細胞における変化を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下での細胞における変化と比較して、工程 (b) で検出された細胞における変化を抑制または増強させる化合物を選択する工程、を含む方法。

10. 細胞における変化が、cAMP 濃度の変化またはカルシウム濃度の変化である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

11. 請求項 5 に記載の蛋白質に結合する抗体。

12. 請求項 7 から 10 のいずれかに記載のスクリーニングにより単離される化合物。

13. 請求項 12 に記載の化合物を有効成分とする医薬組成物。

14. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の治療のための、請求項 13 に記載の医薬組成物。

- 6 4 -

15. 配列番号：5から8、22から26のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチド。

16. 癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断方法であって、被検者由来の該疾患に関連した組織における請求項1に記載のDNAの発現、または被検者における請求項1に記載のDNAの変異追加しましたを検出することを含む方法。

17. 請求項11に記載の抗体または請求項15に記載のヌクレオチドを含む、癌、肝硬変、およびアルツハイマー病からなる群より選択される疾患の診断薬。

1 / 3 4

☒ 1

>sp|P47901|V1BR_HUMAN VASOPRESSIN V1B RECEPTOR (AVPR V1B) (VASOPRESSIN V3 RECEPTOR) (AVPR V3) (ANTIDIURETIC HORMONE RECEPTOR 1B).
Length = 424

Score = 316 (111.2 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 70/194 (36%), Positives = 115/194 (59%)

Query: 56 LWVLFVFTIVGNSVVFSTWRR-KKKSRTFFVTQLAITDSFTGLVNILTDINWRFTGDF 114
L + V GN VL + + +K+SRM FV LA+TD L +L + W T F
Sbjct: 41 LATVLVLATGGNLAVLLTLGQLGRKRSRMHLFVLHLALTDLAVALFQVLPQLLDITYRF 100

Query: 115 TAPDLVCRVVRYLQVLLYASTYVLVSLSIDRYHAIVYPMKFLQGEKQARVLIVIA-WSL 173
PDL+CR V+YLQV+ ++ASTY+L+++++DRY A+ +P++ LQ Q+ L++ A W L
Sbjct: 101 QGPDLLCRAVKYLQVLSMFASTYMLLAMTLDRYLAVCHPLRSLQQPGQSTYLLIAAPWLL 160

Query: 174 SFLFSIPTLIIFGKRTL--SNGEVQCWALWPDDSY-WTP--YMTIVAFVLYFIPLTIISI 228
+ +FS+P + IF R + +G + CWA D + W P Y+T ++ +P+T+++
Sbjct: 161 AAIFSLPQVFIFSLREVIQSGSVLDCWA---DFGFPWGPRAYLTWTLAIFVLPVTMLTA 217

Query: 229 MYGIVIRTIW--IKSKT 243
Y ++ I +K KT
Sbjct: 218 CYSLICHEICKNLKVKT 234

Score = 131 (46.1 bits), Expect = 3.7e-41, Sum P(2) = 3.7e-41
Identities = 33/80 (41%), Positives = 47/80 (58%)

Query: 258 SSYNRGLISKAKIKAIKYSIIIIILAFICCWSPYF---LFDILDNFNLLPDTQERFYASVI 314
SS N IS+AKI+ +K + +I+LA+I CW+P+F ++ + D N PD A I
Sbjct: 267 SSINT--ISRAKIRTVKMTFVIVLAYIACWAPFFSVQMWSVWDK-NA-PDEDSTNVAFTI 322

Query: 315 IQNLPALNSAINPLIYCVFSSSI 337
L LNS NP IY F+S +
Sbjct: 323 SMLLGNLNSCCNPWIYMGFNHL 345

2 / 3 4

☒ 2

>sp|P31388|5H6_RAT 5-HYDROXYTRYPTAMINE 6 RECEPTOR (5-HT-6) (SEROTONIN RECEPTOR)
(ST-B17).

Length = 436

Score = 224 (78.9 bits), Expect = 6.7e-17, P = 6.7e-17

Identities = 84/309 (27%), Positives = 144/309 (46%)

Query: 3 PGEA--LLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCCAYSaelRTRASGVLLVNLslGHLLLAALDM 60
PG + + A L V+++ A ++ L++L C A LR S LV+L L++ + M

Sbjct: 23 PGGSGWVAAALCVVIVLTAAANSLLIVLICTQPA-LRN-TSNFFLVSLFTSDLMVGLVVM 80

Query: 61 PFTLLGVMRGRTSPAGACQVIGFLDTFLASNAALSVAALSADQWLAVGFPLRYAGRRL- 119
P +L + GR A G C + D S + L++ +S D++L + PLRY R+

Sbjct: 81 PPAMLNALYGRWVLARGLCLLWTAFDVMCCSASILNLCLISLDRLYLLSPLRYKLRMTA 140

Query: 120 PRYAGLLLGCAWGQSLAFSGAALGCSWLGYSSAFASCSLRLPPEPERPRFAA---FTATL 176
PR L+LG AW SLA AL S+L + P P + R A F

Sbjct: 141 PRALALILG-AW--SLA----ALA-SFLPLLLGWHELKARTPAPGQCRLLASLPFVLVA 192

Query: 177 HAVGFVLPLAVLCLTSLQVHRVARRHCQRMDTVT-----MKALALLADLHPSVR---- 225
V F LP +C T ++ AR+ ++ ++T ++ L + P +

Sbjct: 193 SGVTFFLPSGAICFTYCRILLAARKQAVQVASLTGTAGQALETQVPRTPRPGMESADS 252

Query: 226 QRCLIQKRRRRHRATRKIGIAIATFLICFAPYVMTRLAELVPFVTVNAQWGILSKCLTYS 285
+R + R+ +A+ +GI + F + + P+ + +A+ V + +L+ L Y

Sbjct: 253 RRLATKHSRKALKASLTIGILLGMFFVTWLPFFVANIAQAVCDCISPGLFDVLT-WLGYC 311

Query: 286 KAVADPFTYSLLRRPFRQVL 305
+ +P Y L R F++ L

Sbjct: 312 NSTMNPIIYPLFMRDFKRAL 331

3 / 3 4

☒ 3

>sp|P56479|GALR_MOUSE GALANIN RECEPTOR TYPE 1 (GAL1-R) (GALR1).

Length = 348

Score = 269 (94.7 bits), Expect = 7.9e-24, P = 7.9e-24

Identities = 82/289 (28%), Positives = 136/289 (47%)

Query: 49 VGFVGNLCVIGILLHNAWKGP-SMIHSLILNLSLADLSLLLFSAPIRATAYSKSVWDLG 107
+G +GN VI +L + GKP S + ILNLS+ADL+ LLF P +AT Y+ W LG

Sbjct: 46 MGVLGNSLVITVLARSK-PGKPRSTTNLFILNLSIADLAYLLFCIPFQATVYALPTWVLG 104

Query: 108 WFFVCKSSDWFIHTCMAAKSLTIVVVA--KVCIFYASDPAKQVSIHNYTIWSVLVAIWTVA 165
F+CK +F M T+ ++ + + S + ++ + V IW ++

Sbjct: 105 AFICKFIHYFFTVMVLSIFTLAAMSVDYVAIVHSRRSSSLRVSRNALLGVGF-IWALS 163

Query: 166 SLLPLPEWFFSTIRHHEGVE-MCLVDVPAVAEEFMSMFGKLYPL--LAFG--LPLFFASF 220
+ P + + H + + C P + K Y + FG LPL F

Sbjct: 164 IAMASPVAYHQRLFHRDSNQTFCWEQWPN-----KLHKKAYVCTFVFGYLLPLLLICF 217

Query: 221 YFWRAYDQCKKRGTKTQNLNRQIRSKQVTMLLSIAIISAVLWLPWVAWLWVWLKAAG 280
+ + + K+ K + +++ K+ +L + ++ + WLP V LW A

Sbjct: 218 CYAKVLNHLHKK-LKNMSKKSEASKKTAQTVLVVVVVFGISWLP HHVHLWAEF--GAF 274

Query: 281 PAPPQGFI--ALSQVLMFSSISANPLIFLMSEEFREGLKGVWKWMITKKPPTVSESQE 337
P P F + L +S SS NP+I+ +SE FR+ K V+K + + P SE++E

Sbjct: 275 PLTPASFFFRITAHCLAYSNSSVNPIIYAFLSENFRKAYKQVFKCHVCDESPR-SETKE 332

4 / 3 4

☒ 4

>sp:NY2R_BOVIN NEUROPEPTIDE Y RECEPTOR TYPE 2 (NPY2-R).
Length = 384

Score = 153 bits (383), Expect = 5e-37

Identities = 93/308 (30%), Positives = 164/308 (53%), Gaps = 7/308 (2%)

Query: 47 DEDEDVTNSRTFFAAKIVIGMALVGIMLVCGIGNFIFIAALVRYKKLRNLTNLLIANLAI 106
D + ++ +S ++V+ +A I+L+ IGN + I ++++K +R +TN IANLA+
Sbjct: 38 DSEPELIDSTKLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLVIHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAV 97

Query: 107 SDFLVAIVCCPFEMDYYVVRQLSWEHGHVLCSTVNYLRTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAI 166
+D LV +C PF + Y ++ + W+ G VLC V Y + +++ VST L IA+DR+ I
Sbjct: 98 ADLLVNTLCLPFTLTITLMGE--WKMGVPLCHLPYAQGLAVQVSTITLTVIALDRHRCI 155

Query: 167 VHPLRPRMKCQTATGLIALVWTVSILIAIPSAYFTTETVLVIVKSQEKIFCGQIWPVDQQ 226
V+ L ++ Q + +I L W VS L+A P A F +++ I+ E + C + WP +++
Sbjct: 156 VYHLESKISKQISFLIIGLAWGVSALLASPLAIFREYSLIEIIPDFEIVACTEKWPGEEK 215

Query: 227 -LYYKSYFLFIFGIEFVGPVVTMTLCYARISRELWFKAVPGFQTEQIRKRLRCRRKTVLV 285
+Y Y L I +V P+ ++ Y RI +L PG + +R R+KT +
Sbjct: 216 GIYGTIYSLSSLILYVPLGLIISFSYTRIWSKLKNHVSPGAHDHYHQR---RQKTTKM 272

Query: 286 LMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFPTVFVKEKHYLTAFYIVECIAMSNMINTLCFVTV 345
L+C++ ++ W P + F + D V + K Y F + IAM ++ N L + +
Sbjct: 273 LVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVDIDSHV-LDLKEYKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWM 331

Query: 346 KNDTVKYF 353
++ K F
Sbjct: 332 NSNYRKAF 339

5 / 3 4

☒ 5

>sp|P97926|OXYR_MOUSE OXYTOCIN RECEPTOR (OT-R).

Length = 388

Score = 164 (57.7 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22

Identities = 57/166 (34%), Positives = 84/166 (50%)

Query: 24 WGLNLTGQGAP-----ASGPPSR-----RVRLVFLGVILVVAVAGNTTVLCRLCGGG 71
 W + L LG G P +GPP R RV + L +IL +A++GN VL L

Sbjct: 9 WSIELDLGSGVPPGAEGNLTAGPPRRNEALARVEVAVLCLILFLALSGNACVLLAL----- 64

Query: 72 GPWAGPKRRKMDFLLVQLALADLYACGGTALSQALWELLGEPRAATGDLACRFLQLLQAS 131
 K ++ F + L++ADL L QL W++ R DL CR ++ LQ

Sbjct: 65 -RTRHKHSRLFFFMKHLADIADLVAVFQVLPQLLWDITF--RFYGPDLLCRLVKYLQVV 121

Query: 132 GRGASAHVLVLIALLERRRAVRLPHGRPLPARA--LAALG-WLLALLLALPPAFV 182
 G AS +L++L++L+R A+ P. R L R LA L WL L+ ++P +

Sbjct: 122 GMFASTYLLLLMSLDRLAICQPL-RSLRRRTDRLAVLATWLGCLVASVPQVHI 174

Score = 155 (54.6 bits), Expect = 8.9e-22, Sum P(2) = 8.9e-22

Identities = 49/161 (30%), Positives = 85/161 (52%)

Query: 217 CHGIFAPLPRWHLQVYAFYEAVAGFVAPVTVLGVACGHLLS--VWW--RHRPQAPAAAAP 272
 C +F + W + Y + +A ++ PV VL AC L+S +W R + A AAAA

Sbjct: 187 CWAVF--IQPWGPKAYVTWITLAVYIVPVIvla-ACYGLISFKIWQNLRLKTAIAAAAAAE 243

Query: 273 WSASPG-----RAPAPSALPRAKVQSLKMSLLLALLFVGCELPYFAARLAAAWS-SG 323
 S + G R + + +AK+++KM+ ++ L F+ C P+F ++ + W +

Sbjct: 244 GSDAAGGAGRAALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIVLAFIVCWTPFFVFQMWVWDVNA 303

Query: 324 PAGDWEGLSAAALRVVAMANSALNPFVYLFFQAGDCRLRRQLRKRLGSLCCA 376
 P E A+ ++A NS NP++Y+ F L +L +R LCC+

Sbjct: 304 PK---EASAFIIAM-LLASLNSCCNPWIYMLFTG---HLFHELVRQF--LCCS 347

6 / 3 4

☒ 6

```

>sp|Q91178|GPRX_ORYLA PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR (FRAGMENT).
      Length = 428

Score = 823 (289.7 bits), Expect = 9.8e-83, P = 9.8e-83
Identities = 182/422 (43%), Positives = 266/422 (63%)

Query:    2 ESSIPQSSGNSSTLGRVPQTPGPSTASGVPEVGL----RDVASESVALFFMLLDLTAV 57
          ++SP+  S  + S          P P+      P+VG+    +    +  LF M+ L+L A+
Sbjct:    5 KTSPMITS DHSISNFSTGLFGPHPTVP---PDVGVVTSSQSQMKDLFG LFCMVTNLIAL 61

Query:    58 AGNAAVMAVIAKTPALRK FVFVHLC LVDLLAALTLMPLAMLSSSALFDHALFGEVACRL 117
          N  VM  IA+ P L+KF FV HLC VD+L A+ LMPL ++SSS F  +F  + C++
Sbjct:    62 LANTGVMVAIARAPHLKKFAFVCHLCAVDVLCAILLMPLGIISSSPFFGT VVFTILECQV 121

Query:    118 YLFLSVC FVSLAILSVSAINVERYYYV VHPMRYEVRMTLGLVASVLGVVWKALAMASVP 177
          Y+FL+V  + L+IL+++AI+VERY+Y+VHPMRYEV+MT+ LV  V++ +W K+L +A V
Sbjct:    122 YIFLNVFLIWLSILTITAISVERYFYIVHPMRYEVKMTINLVIGWMLLIWFKSLLALVT 181

Query:    178 VLGRVSWEEGAPSVPPGCSLQWSHSAYCQLFVVVFAVLYFLLPLLLILVVYCSMFRVARV 237
          + G  +  +      CSL SHS  +F V+F V+ FL P+++I  VY ++++VAR
Sbjct:    182 LFGWPPYGHQSSIAASHCSLHASHSRLRGVFAVLFCVICFLAPVVVIFS VYSAVKVARS 241

Query:    238 AAMQHGP-LPTWME-TP-RQRSESLSSRSTMVTSSGAPQT-TPHRTFGGGA AVVLLAVG 293
          AA+Q  P +PTW + +P + RS+S++S++T++T+  PQ  +P R F GGKAA+ L  +
Sbjct:    242 AALQQVPAVPTWADASPAKDRSDSINSQTITITRTLPQR LSPERAFSGGKAALTAFIV 301

Query:    294 GQFLLCWLPYFSFHL YVALSAQPISTGQVESVVTWIGYFCFTSNPFFYGCLNRQIRGELS 353
          GQFL+CWLP+F FHL ++L+  S G +E V W+ Y F  NP FYG LNRQIR EL
Sbjct:    302 GQFLVCWLPFFIFHLQMSLTGSMKSPGDLEEAVNWLAYSSFAVNPSFYGL LNRQIRDELV 361

Query:    354 K-QFVCFKPAPEEELRLPSREGSIEENFLQFLQGTGCPSES WVSRLPSPKQ-EPPAVD 411
          K +  C  +P  E+  S EGS +ENFLQF+Q T  SE+ S  +P+ E A
Sbjct:    362 KFRRCVTQPV---EIGPSSLEGSFQENFLQFIQRTSSSSETHPSFANSNPRNMENQA-- 416

Query:    412 FRIPGQIAEE 421
          +IPGQI EE
Sbjct:    417 HKIPGQIPEE 426

```


7 / 3 4

☒ 7

>sp|P23749|RTA_RAT PROBABLE G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR RTA.
Length = 343

Score = 461 (162.3 bits), Expect = 2.3e-44, P = 2.3e-44
Identities = 121/323 (37%), Positives = 178/323 (55%)

Query: 2 NQTLNSSGTVESALNYSRGS-TVHT-AYL-----VLSSLAMFTCLCGMAGNSMVIWLLGFR 55
NQ G E+ YSRG T+ A L V + + + CLCG+ GN +V+W GF

Sbjct: 13 NQNMCPGMSEALELYSRGFLTIEQIATLPPPAVTNYIFLLLCLCGLVGNGLVLWFFGFS 72

Query: 56 MHRNPFICIYILNLAAADLLFLFSMASTLSLETQPLVNT-TDKVHELMKRLMYFAYTVGLS 114
+ R PF IY L+LA+AD ++LFS A L + + D V + + + + G+S

Sbjct: 73 IKRTPFSIYFLHLASADGIYLFASKAVIALLNMGTFLGSPDYVRRVSRIVGLCTFFAGVS 132

Query: 115 LLTAISTQRCLSVLFPIWFKCHRPRHLSAWVCGLLWTLCLLMNGLTSSFCCKFL--KFNE 172
LL AIS +RC+SV+FP+W+ RP+ LSA VC LLW L L+ + + FC FL + +

Sbjct: 133 LLPAISIERCVSVIFPMWYRRRPKRLSAGVCALLWLLSFLVTSIHNYFCM-FLGHEASG 191

Query: 173 DRCFRVDMVQAALIMGVLT PVM T L S S L T L F V W V R R S S Q Q W R R Q P T R L F V V V L A S V L V F L I 232
C +D+ L+ + P+M L L L + V +++ R++ +L VVLA V VFL+

Sbjct: 192 TACLNMDISLGILLFFLCPLMVLPCLALILHVECRARR-RQRSALNHVVLAIVSVFLV 250

Query: 233 CSLPLSIYWFVLYWL-SLPPEMQVLCFSLSR L S S S V S S S A N P V I Y F L V G S R R S H R L P T R S 291
S+ L I W F L+W+ +P ++ L ++SSA P++YFL G +S RL

Sbjct: 251 SSIYLGIDWF-LFWVFQIPAPFPEY---VTDLCICINSSAKPIVYFLAGRDKSQRL-WEP 305

Query: 292 LGTVLQQALRE---EPELEGGETPTVGTNEM 319
L V Q+ALR+ EP TP T EM

Sbjct: 306 LRVVFQRALRDGAEPGDAASSTPNTVTMEM 335

8 / 3 4

☒ 8

>sp|Q98907|P2Y3_CHICK P2Y PURINOCEPTOR 3 (P2Y3) (NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE
RECEPTOR).

Length = 328

Score = 452 (159.1 bits), Expect = 2.0e-43, P = 2.0e-43

Identities = 85/185 (45%), Positives = 116/185 (62%)

Query: 15 CQFSEKYKQVYLSLAYSIIIFILGLPLNGTVLWHFWGQTKRWSCATTYLVNLMVADLLYVL 74
C F E++KQV L L YS++F+LGLPLN V+ W K + T Y++NL +ADLLYV
Sbjct: 13 CTFHEEFKQVLLPLVYSVVFLGLPLNAVVGQIWLARKALTRTTIYMLNLAMADLLYVC 72

Query: 75 -LPFLIITYSLDDRWPFGELLCKLVHFLFYINLYGSILLTLCISVHQFLGVCHPLCSLPY 133
LP LI Y+ D WPGF+ CK V F FY NL+GSIL LTCISV +++G+CHPL S
Sbjct: 73 SLPLLIYNYTQKDYWPGDFTCKFVRFQFYTNLHGSILFLTLCISVQRYMGICHPLASWHK 132

Query: 134 RT-RRHAWLGTSTTWALVVLQLLPTLAFSHTDYINGQMIWYDMTSQENFDRLFAYGIVLT 192
+ ++ WL + W +V+ Q LPT F+ T + + YD++ + F YGI LT
Sbjct: 133 KKGKKLTWLVCAAVWFIVIAQCLPTFVFASTGTQRNRTVCYDLSPDRSTSYFPYGITLT 192

Query: 193 LSGFL 197
++GFL
Sbjct: 193 ITGFL 197

9 / 3 4

☒ 9

>sp|002824|A1AA_RABIT ALPHA-1A ADRENERGIC RECEPTOR (ALPHA 1A-ADRENOCEPTOR)
 (ALPHA-1C ADRENERGIC RECEPTOR).
 Length = 466

Score = 295 (103.8 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
 Identities = 66/215 (30%), Positives = 113/215 (52%)

Query: 8 STRESNSSHTCMPISKMPISLAHGIIRSTVLVIFLAASFVGNIVLALVLQRKPQLLQVTN 67
 S S+SS+ P + P++++ I+ +L + +GNI++ L + L VT+
 Sbjct: 5 SGNASDSSNCTHPPA--PVNISKAILLGVLGGLILFGVLGNILVILSVACHRHLSVTH 62

Query: 68 RFIFNLLVTDLLQISLVAPVWVATSVPLFWPLNSHFCTALVSLTHLFAFASVNTIVVSV 127
 +I NL V DLL S V P+ + +W FC ++ L AS+ ++ V+S+
 Sbjct: 63 YYIVNLAVADLLLTSTVLPFSAIFEILGYWAFGRVFCNIWAAVDVLCCTASIISLCVISI 122

Query: 128 DRYLSIIHPLSYPSKMTQRRGYLLLYGTWIVAILQSTPPLYGWGQAADFERNALCSMIWG 187
 DRY+ + +PL YP+ +TQRRG L W +++ S PL+GW Q A D+ +C +
 Sbjct: 123 DRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLRALLCVWAFSLVISVGPLFGWRQPAPDDET-ICQI--N 179

Query: 188 ASPSYTILSVVSFIVIPLIVMIACYSVVFCAARRQ 222
 P Y + S + +PL +++A Y V+ A+R+
 Sbjct: 180 EEPGYVLFSAIGSFYVPLTIILAMYCRVYVAKRE 214

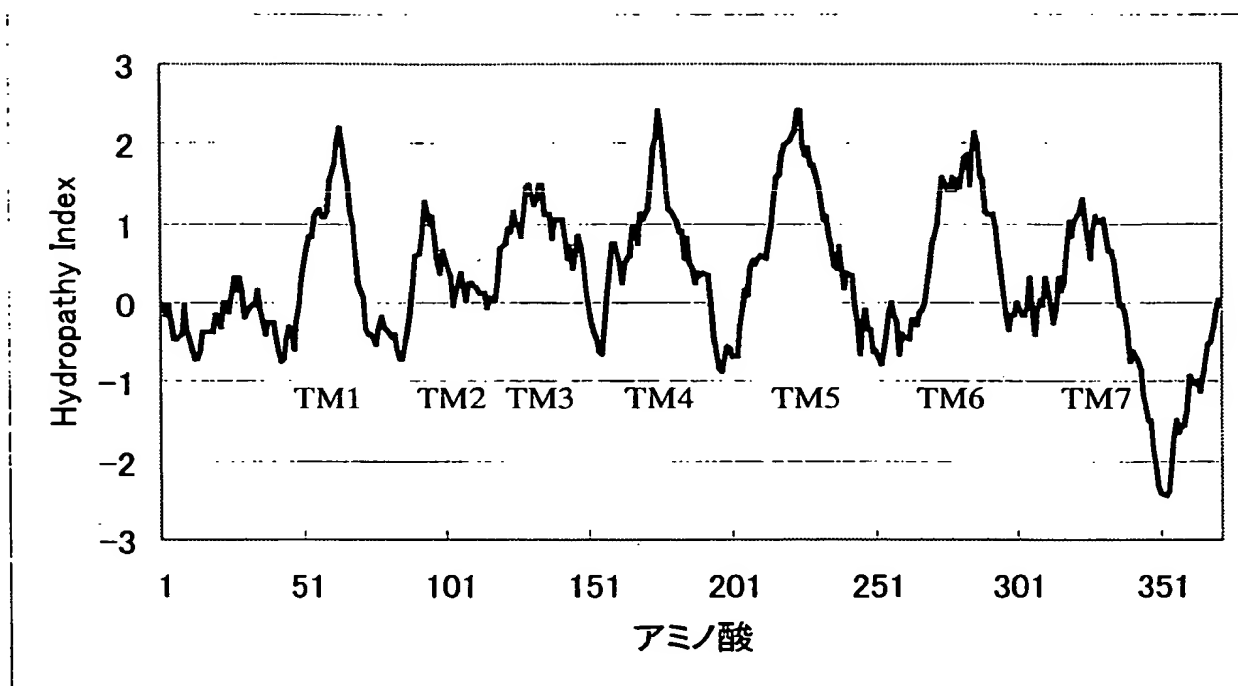
Score = 106 (37.3 bits), Expect = 1.0e-31, Sum P(2) = 1.0e-31
 Identities = 23/75 (30%), Positives = 41/75 (54%)

Query: 396 KAAKVIFIIIFSIVLSLGPYCFVLAVLWVDVETQVPQWVITIIWLFFLQCCIHPPYVYG 455
 KAAK + I++ +VL P+ + + + + + P+ V I+ WL +L CI+P +Y
 Sbjct: 269 KAAKTLGIVVGCFLVLCWLPFFLVMPIGSFFP-DFKPPETVFKIVFWLGYLNSCINPIIYP 327

Query: 456 YMHKTIKKEIQDMLK 470
 + KK Q++LK
 Sbjct: 328 CSSQEFKKAQFQNVLK 342

10/34

図 10



1 1 / 3 4

☒ 1 1

X64878
U82440
X93313
X87783
AF184966
X76321
AF147743
GPRv8
AE003754

MEGALAAN---WSA-EAA-NASAAPPGAEG-----NRTAGPPRRNEALARVEVAVLCLIL
MEGELAAN---WST-EAV-NSSAAPPGAEG-----NCTAGPPRRNEALARVEVAVLCLIL
MEGLCLNL---DCS-ELP-NSSWVNSSMENQNHSSNSTRDPLKRNEEVAKVEVTVLALIL
MEEMFKEQDF-WSFNESRSTVGNETFGG-----NQTVNPLKRNEEVAKVEVTVLALVL
-----MEKPGNITLHP-----NGSDPFGRNEEVAQIEIMVLSITF
-----MGRIANQTTAS-----NDTDPFGRNEEVAKMEITVLSVTF
MKNFSFPMQD-STHQTESPPHRLLSLTNKS-----DPVGRPERDEQLAQVEIAVLGVIF
MPANFTEGSFDSSGTQTLDS SPVACTETVTFTEVVEGKEWGSFYYSFKTEQLITLWVLF
-----MKCDHTLFFALFQTEQFAVLWILF

. . . * : :

X64878
U82440
X93313
X87783
AF184966
X76321
AF147743
GPRv8
AE003754

TM1 *****

***** TM2 *****

LLALSGNACVLLALRTTRQKHSRLFFFMKHLSIADLVVAVFQVLPQLLWDITFRFYGPDL
FLALSGNACVLLALRTTRHKHSRLFFFMKHLSIADLVVAVFQVLPQLLWDITFRFYGPDL
FLALAGNICVLLGIYINRHKHSRMYFFMKHLSIADLVVAIFQVLPQLIWDITFRFYAPDL
FLALAGNLCVLIAYTAKHTQSRMYLMLKHLSIADLVVAVFQVLPQLIWDITFRFYGPDL
VVAVIGNVSULLAMYNTKKKMSRMHLFIKHLSLADLVVAFFQVLPQLCWEITYRFFGPDF
FVAVIGNLSVLLAMHNTKKKSSRMHLFIKHLSLADMVVAFFQVLPQLCWEITYRFFGPDF
LTASVGNFILIILVLRRRKKLSRMVYFMLHLSIADLVVAFFQVLPQLIWDITDVFIGPDF
VFTIVGNSVVLFTWR-RKKKSRMTFFVTQLAITDSFTGLVNILTDINWRFTGDFATPDL
TVIVLGN SAVLFVMFINKNRKSRMNYFIKQALADLCVGLLNVLTDIWRITISWRAGNL

** : : : ** : : : * : : * : : : * : : *

X64878
U82440
X93313
X87783
AF184966
X76321
AF147743
GPRv8
AE003754

***** TM3 *****

***** TM4 *

LCRLVKYLQVVGMAFASTYLLLLMSLDRCIAICQPLRSLRRRT--DRLAVLATWLGCLVAS
LCRLVKYLQVVGMAFASTYLLLLMSLDRCIAICQPLRSLRRRT--DRLAVLATWLGCLVAS
VCRLVTYLQVVGMAFASTYMLLLMSLDRCIAICQPLRSLHRRS--DCVYVFTWILSFLLS
LCRLVKYLQTVGMAFASTYMLVLSIDRCIAICQPLRSLHKKR--DRCYVIVSWALSLVFS
LCRIVKHLQVTGMAFASTYMMVMMTLDRYIAICHPLKTLQOPTQRSYIMIVSTWMC SLVFS
LCRIVKHLQVLGMAFASTYMMVMMTLDRYIAICHPLKTLQOPTQRAYIMIGSTWLC SLLLS
LCRIIKYLQLLGMAFASTYMIIVMTVDRYQAVCPMVTQKKRALWNIPICTSWSISLILS
VCRVRYLQVVLVASTYVLVLSIDRYHAIVYPMKFLQGEKQ-ARVLIVIAWSLSFLFS
ACKAIRFSQVCVTYSSTYVLVAMSIDRYDAITHPMNFSKSWKR-ARHLVAGAWLISALFS

* : . * : : * : : * : : * : : * : : *

X64878
U82440
X93313
X87783
AF184966
X76321
AF147743
GPRv8
AE003754

@

***** TM5 *****

APQVHIFSLREVADG--VFDCWAVFIQP--WGPKAYITWITLAVYIVPVIVLATCYGLIS
APQVHIFSLREVADG--VFDCWAVFIQP--WGPKAYITWITLAVYIVPVIVLAACYGLIS
TPQTVIFSLTEVCNG--VYDCRADFIQP--WGPKAYITWITLAVYIIPVMILSVCYGLIS
VPQVYIFSLREIGNG--VYDCWGFVQV--WGAKAYITWISLTIYIIPVAILGGCYGLIS
TPQYFIFSLSEVKNGSTVKDCWAHFI EP--WGARAYITWITGGIFLVPVIVLMCYGFIC
TPQYFIFSLSEIQNGSYVYDCWGHFI EP--WGI RAYITWITVGIFLIPVILMICYGFIC
LPQVFIFSKIEISPG--IFECWAEFIQP--WGPRAYVTWILVVIFFIPSTILITCQVKIC
IPTLIIFGKRTLSNG--EVQCWALWPDDSYWTP--YMTIVAFVLYFIPLTIISIMYGIVI
LPILVLYEEKLIQGH--PQCWIELGSPIAWQV--YMSLVSATLFAIPALIIISACYAIV

* : : : * : : * : : * : : *

1 2 / 3 4

☒ 1 2

```

X64878      FKIWQNLRLKTAATAAAAEPEGAAAGDGGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIVLAF
U82440      FKIWQNLRLKTAATAAAAEPEGAAAGDGGRVALARVSSVKLISKAKIRTVKMTFIIVLAF
X93313      YKIWQNLRLKTVCESNRLST-----SRRATLSRVSSVRLISKAKIRTVKMTFIIVLAY
X87783      FKIWQNFKRKTKKQDCITLTAA-----SKANALARVSSVKLVSKAKITTVKMTFVIVLAY
AF184966    HTIWKNIKYKKRKTIPGAAS-----KNGLIGKNSVSSVTISRACLRTVKMTFVIVLAY
X76321      HSIWKNIKCK---TMRGTRNT-----KDMIGKVS SVSTISRACLRTVKMTLVIIVLAY
AF147743    KIIKRNIYVKKQNEYQVTNQ-----KQVLP SRASSVNCISKAMIKTVKMTIVTVVAY
GPRv8       RTIWIKSKTYETVISNCSG-----KLCSSYNRGLISKAKIKAIKYSIIIIILAF
AE003754    KTIWAKGSIFVPTERAGFGA-----APARRASSRGIIPRAKVTVKMTLTIVFVF
          * : . . . * : : * : : . .

##### TM6

X64878      IVCWTPFFFVQMWVWDANAPK---EASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHELV
U82440      IVCWTPFFFVQMWVWDANAPK---EASAFIIVMLLASLNSCCNPWIYMLFTGHLFHELV
X93313      IVCWTPFFFVQMWVWDPNPPK---EASLFIAMLLGSLNSCCNPWIYMLFTGHLFHDLL
X87783      IVCWTPFFFVQMWVWDPEAPR---EAMPFIISMLLASLNSCCNPWIYMFAGHLFHDLL
AF184966    ICWAPFFTQMWVWDENFQYADSENTAVTISALLASLNSCCNPWIYMFSGHLLQDFM
X76321      IVCWAPFFIVQMWVWDENFSWDDSENAAVTISALLASLNSCCNPWIYMLFSGHLLYDFL
AF147743    VLCWSPFFIAQLWSVWFPSGIT---EGSAFTIIMLLGNLNSCTNPWIYMYFCGHIPIY---
GPRv8       ICCWSPYFLFDILDNFNLLPDT-QERFYASVIQNLPALNSAINPLIYCVFSSSISFP--
AE003754    ICWSPYIFDQLQVFGQIPHS-QTNIAIATFIQSLAPLNSAANPLIYCLFSSQVFTLS
          : **:*:: : . : . : * ***. ** ** * . :

X64878      QR-----FLCCSASYLKGRRLG--ETSASKKSN-----SSSFVLSHRSSSQRSQS
U82440      QR-----FLCCSASYLKGNRLG--ETSTSKKSN-----SSSFVLSHRSSSQRSQS
X93313      QS-----FLCCSARYLKTQQQS-DLSASRKN-----SSTFVLSRKSQKSITQPS
X87783      QS-----LLCCSTLYLKSSQCRCDQEHSRKN-----CSTYVIKSTSS-QRSITQSS
AF184966    NC-----FAWCRRANADFKED--SDSSIRRTT-----LLTKMTN-RSPTGSTGNWRD
X76321      RC-----FPCCKKPRNMLQED--SDSSIRRTT-----LLTKLAAGRMTNDGFGSWRD
AF147743    -----CTNKQLENTSAQ--EDSVVTGS-----IHLVD-RDPEENSTCA--
GPRv8       -----CREQRSQDSRMT---FRERTER-----HEMQILS--KP-EF-----
AE003754    RFPPFKWFTCCCKSYRNNSQQNRCHTVGRRLHNSCDSMRTLTTSLTVSRRSTNKTNARVV
          * : .

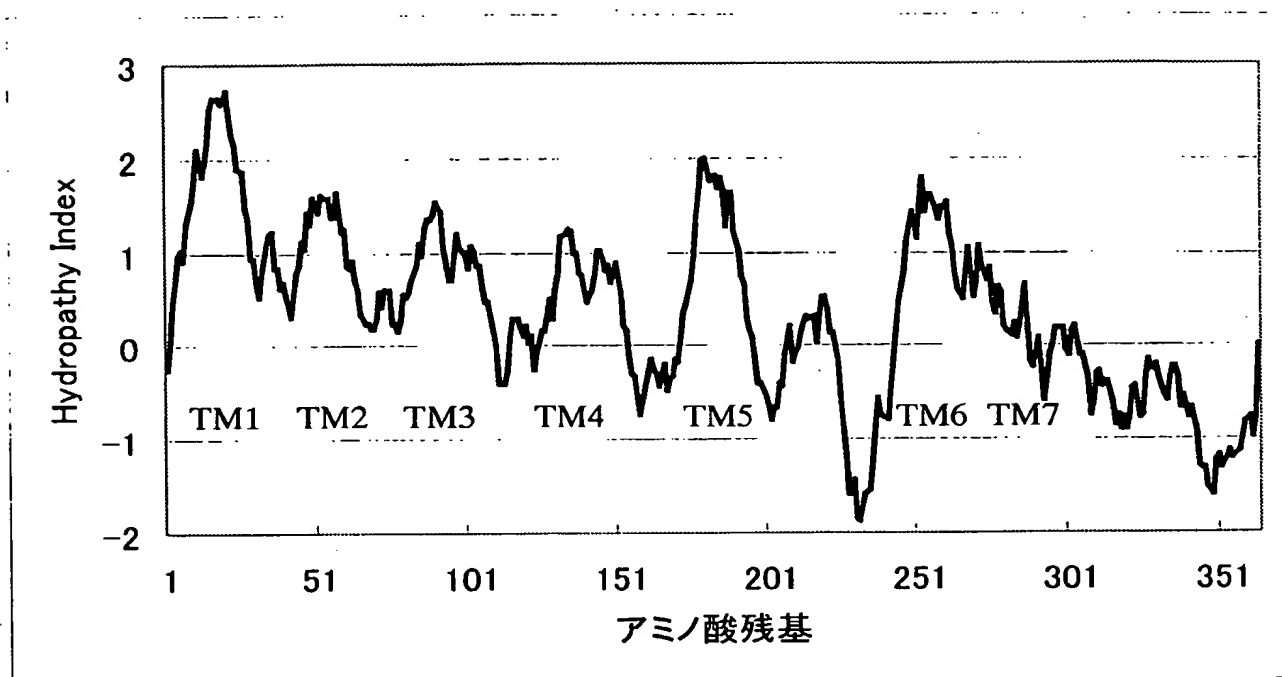
X64878      TA-----
U82440      TA-----
X93313      TA-----
X87783      IT-----
AF184966    LDNSPK--TSIQME-----
X76321      PCNSRKSSQSIGLDCFCCKSSQCLEHDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCIPLDCSRKSSQCMS
AF147743    -----
GPRv8       -----
AE003754    ICERPTKVVTVPAMSERRGVSLKGNTDIL-----

X64878      ---
U82440      ---
X93313      ---
X87783      ---
AF184966    ---
X76321      KES
AF147743    ---
GPRv8       ---
AE003754    ---

```

13 / 34

図 13



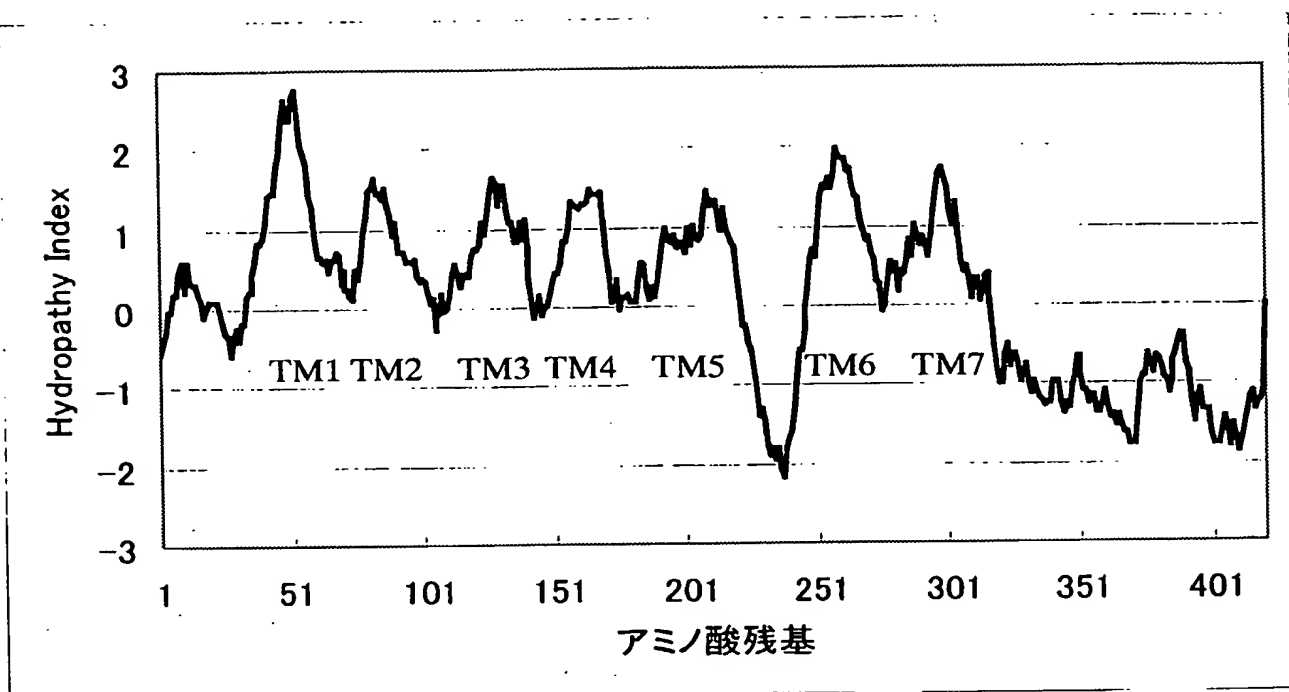
$14/34$

图 14

	##### TM1 #####	##### TM2 ###
GPRv12_ORF	MGPGEALLAGLLVMVLAVALLSNALVLLCCAYSaelRTRASGVLLVNLslGHLLLAALDM	
AF208288	MNSWDAGLAGLLVGTIGVSLLSNGLVLLCLLHSADIRrQAPALFTLNLTCGNLLCTVVNM	
	.. : ##### ..*:****.***** :***:* :*..:: :** :*** ..:*	
	##### @##### TM3 #####	
GPRv12_ORF	PFTLLGVMRGRTPSAPGACQVIGFLDTFLASNAALSVAALSADQWLAVGFPLRYAGRlRP	
AF208288	PLTLAGVVAQRQPAGDRLCRLAAFLDTFLAANSMLsMAALSIDRWVAVVfPLSYRAKMRL	
	*:** **: * *.. *:. *****:* :***** *:*** ** * ..:*	
	##### TM4 ##### @ #####	
GPRv12_ORF	RYAGLLLGCawGQSLAFSGAALGCSWLGySSAFASCSLRLPPEPERPRFAAFTATLHAVG	
AF208288	RDAAFMVAYTWLHALTFPATALALSWLGFHQLYASCTLCsRRPDERLRFavFTSAFHALS	
	* *.:::. :* :*:*.:.:*. *****. :.*****: ** ***.**:::*.:	
	TM5 #####	##
GPRv12_ORF	FVLPLAVLCLTSLQVHRVARRHCQRMDTVTMKALALLADLHPSVRQRCLlQQKRRRHRAT	
AF208288	FLLSFIVLCFTYLKVLKVARFHCKRIDVITMQTLVLLVDIHPSVRERCLEEQRrrRQRAT	
	:. : ***:* *:~ *** **:**. :*:~*. **.*:*****:*** :*****:***	
	##### TM6 #####	##### TM7 #####
GPRv12_ORF	RKIGIAIATFLICFAPYVMTRLAELVPFVTVNAQWgILSKCLTYSKAVADPFTYSLLRRP	
AF208288	KKISTFIGTFLVCFAPYVITRLVELFSTAPIOSHwGVLSKCLAYSKAASDPFVYSLLRHQ	
	:** . *.***:*****:***.**. ..:::~*:*****:****. :***.*****:	
GPRv12_ORF	FRQVLagMVHrLLKRTPRPASTHDSSLDVagMVHQLLKRTPRPASTHNGSVDTENDSCLQ	
AF208288	YRRsCKELLNRIFNRR----SIHsVGLTGDSHSQNI LPSE-----	
	: ::~*:~ * *. . * :~* :	
GPRv12_ORF	QTH	
AF208288	---	

15 / 34

図 15



1 6 / 3 4

☒ 1 6

```
*****
***** TM1 *****
1 MLAAAFADSN SSSMNVSAH LHFAGGYLPS DSQDWTIIP ALLVAVCLVG FVGNLCVIGI 60

*****
## ***** TM2 *****
61 LLHNAWKGP SMIHSLILNL SLADLSLLLF SAPIRATAYS KSVWDLGWV CKSSDWFHT 120

*****
@***** TM3 ***** ***** TM4 *****
121 CMAAKSLTIV VVAKVCFMYA SDPAKQVSIH NYTIWSVLVA IWTVASLLPL PEWFFSTIRH 180

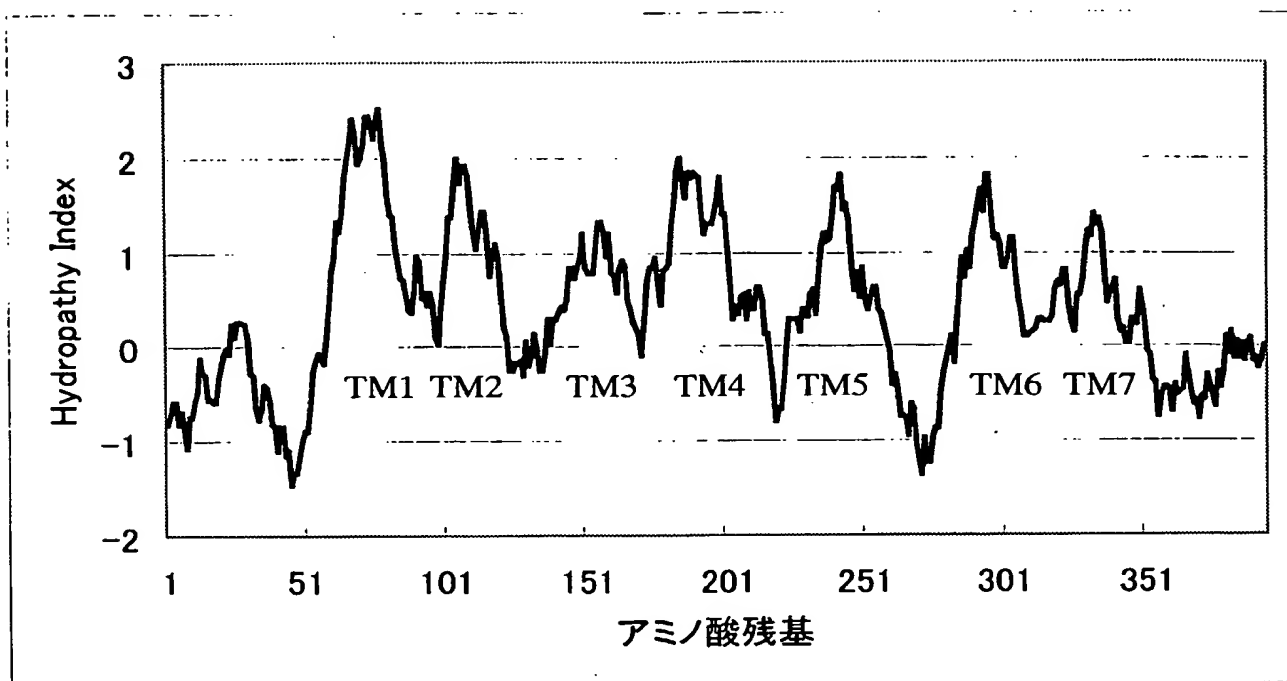
*****
@ ***** TM5 *****
181 HEGVEMCLVD VPAVAEEFMS MFGKLYPLLA FGLPLFFASF YFWRAYDQCK KRGTKTQNL 240

*****
***** TM6 ***** ***** TM7 ##
241 NQIRSKQTV MLLSIAIISA VLWLPEWVAW LWVWHLKAAG PAPPQGFIAL SQVLMFSISS 300

*****
*****
301 ANPLIFLVMS EEFREGLKGV WKWMITKKPP TVSESQETPA GNSEGLPDKV PSPESPASIP 360
361 EKEKPSSPSS GKGKTEKAEI PILPDVEQFW HERDTVPSVQ DNDPIWEHE DQETGEGVK 419
```

17 / 34

図 17



18 / 34

☒ 18

GPRv21 -----METTMGFMDNATNTSTSFLSVLNPHGAHA-TSFPFN
AL121755 -----
AF236082 -----METTVGALGENTDTFTDFFSALDGHEAQT-GSLPFT
U42766 -----MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGP-----
U76254 -----MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGP-----
U42389 -----MGPIGAEADENQTVEEMKVEQYGP-----
U50144 -----MKMGPLGAEADENQTVEEMKVDQFGPG-----
D86238 -----MVLKMGPLGAEADEN-QTVEVKVEPYGPG-----
M81490 MYYIAHQQPMLRNEDDNYQEGYFIRDPASLIYNTTALPADDEGSNYGYGSTT-TLSGLQ
AF037444 --MSMANSENSTSLFGIKRHADVTGPHSASHDVIDPSNTSVYYDHASNYESVLSTTSTLM

TM1
GPRv21 FSYSYDYMPL-----DEDEDVTNSR-----TFFAAKIVIGMALVGIMLVCGIGNFIF
AL121755 --YGDYDLP-----DEEDMTKTR-----TFFAAKIVIGIALAGIMLVCGIGNFVF
AF236082 FSYGDYDMP-----DEEDVTNSR-----TFFAAKIVIGMALVGIMLVCGIGNFIF
U42766 QTTPRGELVP-----DPEPELIDST-----KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLV
U76254 QTTPRGELVP-----DPEPELIDST-----KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLV
U42389 QTTPRGELVP-----DPEPELIDST-----KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLV
U50144 HTTLPGELAP-----DSEPELIDST-----KLIEVQVVLILAYCSIILLGVIGNSLV
D86238 HTTLPRELPP-----DPEPELIDST-----KLVEVQVILILAYCSIILLGVVGNLSV
M81490 FETYNITVMMNFSCDDYDLLSEDMW-----SSAYFKIIVYMLYIPIFIFALIGNGTV
AF037444 LKLTDLVTPFNASEPDPEPNGSDTDGGHAAISEQPMYAKVIVLMYVLIILVAVGGNLLF

***** TM2 *****
GPRv21 IAAVRYKKLRNLTNLLIANLAISDFLVAIVCCPFEMDYVVRQLSWEHGHVLCSTSVNYL
AL121755 IAAVRYKKLRNLTNLLIANLAISDFLVAIVCCPFEMDYVVRQLSWEHGHVLCASVNYL
AF236082 IAAVRYKKLRNLTNLLIANLAISDFLVAIVCCPFEMDYVVRQLSWEHGHVLCASVNYL
U42766 IHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTLCPLPFTLTYYTLMG--EWKMGVPLCHLVPIYA
U76254 IHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTLCPLPFTLTYYTLMG--EWKMGVPLCHLVPIYA
U42389 IHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTLCPLPFTLTYYTLMG--EWKMGVPLCHLVPIYA
U50144 IHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTLCPLPFTLTYYTLMG--EWKMGVPLCHLVPIYA
D86238 IHVVIKFKSMRTVTNFFIANLAVADLLVNTLCPLPFTLTYYTLMG--EWKMGVPLCHLVPIYA
M81490 CYIVYSTPRMRTVTNYFIASLAIGDILMSFFCEPSSFISLFILN-YWPFGLALCHFVNYS
AF037444 SYVIVMYPKMRSVTNLFLNLAISDIVKAVICNPFANLILL-YWPGYGFMCQVVTYI
: : * : * : : * : * : : * : * : * : * : *

TM3 ##### TM4 #####
GPRv21 RTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAIVHPLRPRMKCQTATGLIALVWTVSILIAIPSAFTTE
AL121755 RTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAIVHPLKPRMNYQTASFLIALVWTVSILIAIPSAFATE
AF236082 RTVSLYVSTNALLAIAIDRYLAIVHPLRPRMKCQTAAGLIFLVWSVSILIAIPAAFTTE
U42766 QGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKISKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREY
U76254 QGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKISKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREY
U42389 QGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKISKRISFLIIGLWGRISALLASPLAIFREY
U50144 QGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKISKQISFLIIGLAWGVSALLASPLAIFREY
D86238 QGLAVQVSTITLTVIALDRHRCIVYHLESKISKRISFLIIGLAWGISALLASPLAIFREY
M81490 QAVSVLVSAITLVAISIDRYIAIMWPLKPRITKRYATFIAGVWFIALATALPIPIVSGL
AF037444 QVVAVFLSAFTLVAMSVDRYVAIKPMRPRLSKRAFAITMATIWIILSLSAPLPTAITSRV
: : : * : * : : * : : : : : * : : * : *

19 / 34

☒ 19

@ ***** TM5 *****

GPRv21	TVLVIVKSQ--EKIFCGQIWPVDQ--LYYKSYFLIFGIEFVGPVVTMTLCYARISRELW
AL121755	TVLFIVKSQ--EKIFCGQIWPVDQ--LYYKSYFLIFGVEFVGPVVTMTLCYARISRELW
AF236082	TVLVIVERQ--EKIFCGQIWPVDQ--FYRSYFLLVFGLEFVGPVVTMTLCYARVSRELW
U42766	SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEESYIGTVYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLG
U76254	SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEESYIGTVYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLG
U42389	SLIEIIPDF--EIVPCTEKWPAAESYIGTVYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLG
U50144	SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEESYIGTVYSLSSLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLG
D86238	SLIEIIPDF--EIVACTEKWPGEESYIGTVYSLSTLLILYVLPLGIISFSYTRIWSKLG
M81490	DIPMSPWHTKCEKYICREMWPSRSQ---EYYTTLSEFALQFVPLGLIFTYARITIRVW
AF037444	TKQSNSTGL-----CLEHFENDHN---RYIYSIVIMMLQYFVPLAVITVTNTHIGYIVW

* : : : * : : : * : : : :

***** TM6 *****

GPRv21	FKAVPG-FQTEQIRKRLRCRRKTVLVLMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFPTVFVKEKH
AL121755	FKAVPG-FQTEQIRKRLRCRRKTVLVLMCILTAYVLCWAPFYGFTIVRDFPTVFVKEKH
AF236082	FKAVPG-FQTEQIRRTVRCRRRTVLGLVCLVLSAYVLCWAPFYGFTIVRDFPSPVFVKEKH
U42766	NHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE
U76254	SHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE
U42389	NHVSPG-AANDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-IDSQVLDLKE
U50144	NHVSPG-AAHDHYHQR---RQKTTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-IDSHVLDLKE
D86238	NHVSPG-AASDHYHQR---RHKMTKMLVCVVVFAVSWLPLHAFQLAVD-IDSHVLDLKE
M81490	AKRPPGEAETNRDQRMARSKRMVKMMLTVVIVFTCCWLPFNILQLLN--DEEFAHWDP
AF037444	IKKTPGEAEEDRRRMAASKRRLVKMIIVVVIYAVCWLPVHVITLVGD-HNPDINYQPH

: ** : : : : : : : : * * : : :

***** TM7 *****

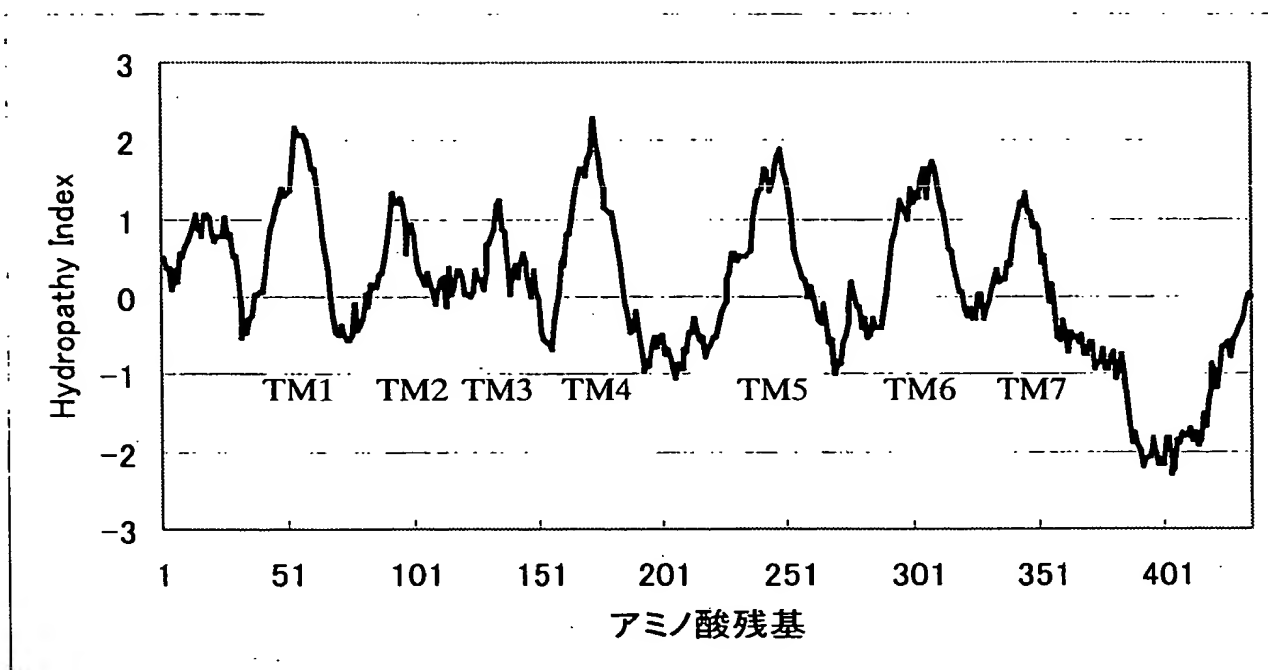
GPRv21	YLTAFYIVECIAMNSMINTLCFVTVKNDTVKYFKKIML-----LHWKASYNGGKS
AL121755	YLTAFYVVECIAMNSMINTVCFVTVKNNMKEYFKKMML-----LHWRPSQRGSKS
AF236082	YLTAFYVVECIAMNSMINTLCFVTVRNNTSKYLKRI LR-----LQWRASPSGSKA
U42766	YKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLDAIHSEV
U76254	YKLIFTVFYIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLDAIHSEV
U42389	YKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLDAIHSEV
U50144	YKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLDAIHSEV
D86238	YKLIFTVFHIIAMCSTFANPLLYGWMNSNYRKAFLSAFR-----CEQRLDAIHSEV
M81490	LPYVWF AFHWLAMS HCCYNPIIYCYMNARFRSGFVQLMHRMPGLRRWCCLRSVGDRMNAT
AF037444	MNVVWLCAQWLAMS HSCYNPFVYFSLSATFRRNLRRMTHACRLKQKR-LRQHLSMRSSRA

: : ** * . : : :

GPRv21	S-----ADLDLKTIGM---PATEEVDCIRLK-----
AL121755	S-----ADLDLRTNGV---PTTEEVDCIRLK-----
AF236082	S-----ADLDLRTTGI---PATEEVDCIRLK-----
U42766	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG---PNDSFTEATNV-----
U76254	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG---PNDSFTEATNV-----
U42389	SVTFKAK-----KNLEVRKNSG---PNDSFTEATNV-----
U50144	SVTFKAK-----KHLQVTKNNG---PNDSFTETTNV-----
D86238	SMTFKAK-----KNLEVKKNNNG---PTDSFSEATNV-----
M81490	SGTGPALPLN---RMNTSTTYISARRKPRATSLRANPLSCGETSPLR-----
AF037444	DAWDRDTEVYGSAESIPSKVSAGSLHSSNRGAKHVNTSSGEWQCLKEKKLKGVSNDMYL

20/34

図 20



2 1 / 3 4

☒ 2 1

```

**
##### TM1 ##
1 MEDLFSPSIL PPAPNISVPI LLGWGLNLTLL GQGAPASGPP SRRVRLVFLG VILVVAVAGN 60

*****
#### ##### TM2 #####
61 TTVLCRLCGG GGPWAGPKRR KMDFLLVQLA LADLYACGGT ALSQLAWELL GEPRAATGDL 120

*****
@ ##### TM3 ##### ##### TM4 ####
121 ACRFLQLLQA SGRGASAHV VLIALERRRA VRLPHGRPLP ARALAALGWL LALLLALPPA 180

*

#####
### @ ##### TM5
181 FVVRGDSPSP LPPPPPTSL QPGAPPAARA WPGQRRCHGI FAPLPRWHLQ VYAFYEAVAG 240

*****
#####
241 FVAPVTVLGV ACGHLLSVWW RHRPQAPAAA APWSASPGRA PAPSALPRAK VQSLKMSLLL 300

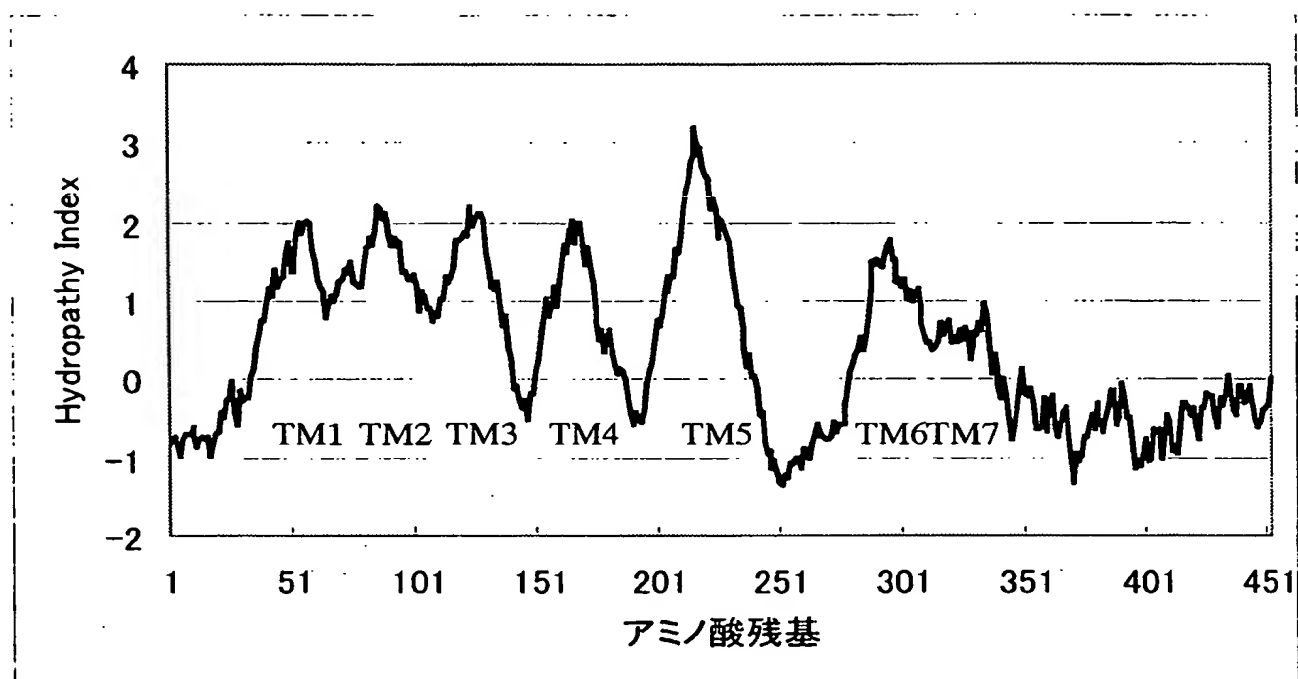
*****
# TM6 ##### ##### TM7 #####
301 ALLFVGCELP YFAARLAAAW SSGPAGDWEG EGLSAALRVV AMANSALNPF VYLFFQAGDC 360

361 RLRRQLRKRL GSLCCAPQGG AEDEEGPRGH QALYRQRWPH PHYHHARREP LDEGGLRPPP 420

421 PRPRPLPCSC ESAF
```

22 / 34

図 22



23 / 34

☒ 23

HSH2R_1
D49783
M32701
U25440
S57565
S73473
M74716
U64032
L41147
GPRv47
D43633

MTFRDLLSVTFEGPRPDISAGGSGAGGAGAGAGDTASSESPAVGGVPGAAGGGGGGS

HSH2R_1
D49783
M32701
U25440
S57565
S73473
M74716
U64032
L41147
GPRv47
D43633

-----NG-----TASSFCLDSTACKIT-----ITV
-----MAP-----NG-----TASSFCLDSTACKIT-----ITV
-----MIS-----NG-----TGSSFCLDSPPCRIT-----VSV
-----MAF-----NG-----TVPSFCMDFTVYKVT-----ISV
-----MEP-----NG-----TVHSCCLDSMALKVT-----ISV
-----MAPWPHKNGS-----LAFWSDAPTLDPSAANTSGLPG-VPW-AAAL
-----MAPWPHKNGS-----LAFWSDAPTLDPSAANTSGLPG-VPW-AAAL
VVGAGSGEDNRSSAGEPGGAGGGGE-----VNGTAAVGGLVVSAQSVG-----VG
-----MVP-----EPGPT-----ANSTPAWGAGPPSAPGGSG-----WVAA
-----MESSPIPQSSGNSSTLGRVPQTGPSTASGVPEVGLRDV-ASESVALF
-----MMADKTSPIITSDHSISNFSTGLFGPHPTVPPDVGVVTSQSQMKDLFGLF

HSH2R_1
D49783
M32701
U25440
S57565
S73473
M74716
U64032
L41147
GPRv47
D43633

TM1 ##### TM2 #####
VLAVLILITVAGNVVCLAVGLNRRLRNLTNCFIVSLAITDLLLGLLVLPFSAIYQLSCK
VLAVLILITVAGNVVCLAVGLNRRLRNLTNCFIVSLAITDLLLGLLVLPFSAIYQLSCK
VLTVLILITVAGNVVCLAVGLNRRLRSLTNCFIVSLAITDLLLGLLVLPFSAFYQLSCK
ILILILITVAGNVVCLAVGLNRRLRSLTNCFIVSLAVTDLLLGLLVLPFSAIYQLSCK
VLTTLILITVAGNVVCLAVGLNRRLRSLTNCFIVSLAATDLLLGLLVLPFSAIYQLSFT
AGALLALATVGGNLLVITAIARTPRLQITNVFVTSLATADLVVGLLVMPPGATLALTGH
AGALLALATVGGNLLVITAIARTPRLQITNVFVTSLATADLVVGLLVMPPGATLALTGH
FLAAFIILTAVAGNLLVILSVACNRHLQTVTNFYVNLAVADLLSATVLPFSATMEVLGF
ALCVVIALTAANSLLIALICTQPALRNTSNFFLVSLFSDLMVGLVVMPPAMLNALYGR
FMLLDLTAVAGNAVMVAIAKTPALRKVFVFLCLVDLLAALTLMLPLMLSSALFDH
CMVTLNLIALANTGVMAIAARAPHLKKFAFVCHLCAVDVLCAILLMPLGISSSPFFGT

@##### TM3 ##### TM4
WSFGKVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLVTPARVAISLVLIW
WSFGKVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLVTPARVAISLVLIW
WSFGKVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLITPVRVAVSLVLIW
WSFGKVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLITPVRVAVSLVLIW
WSFGHVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAVMDPLRYPVLVTPARVAISLVFIW
WPLGATGCELWTSVDVLCVTASIELCALAVDRYLAVTNPLRYGTLVTKRRARAAYVLVW
WPLGATGCELWTSVDVLCVTASIELCALAVDRYLAVTNPLRYGTLVTKRRARAAYVLVW
WAFGRAFCDVWAAVDVLCCTASILSLCTISVDRYVGRHSLKYPAMTERKAAAIALLLW
WVLARGLCCLWTAFDVMCCSASILNLCILSLDRYLLISPLRYKLRMTPLRALALVLCAN
ALFGEVACRLYLFLSVCFVSLAISVSAINVERYVYVHPMRYEVKMTLGLVASVLVGVW
VVFTILECQVYIFLNVFLIWLISILTITAISSVERYFYIVHPMRYEVKMTINLVIGVMLLIW

24 / 34

☒ 24

```

#####
HSH2R_1 VISITLSFLSIHLGWN---SRNETSKGNHTTSKCN-----VQVNEVYGLVDGLVTFYLPLLIMCI
D49783 VISITLSFLSIHLGWN---SRNETSKGNHTTSKCK-----VQVNEVYGLVDGLVTFYLPLLIMCI
M32701 VISITLSFLSIHLGWN---SRNETSSFNHTIPKCK-----VQVNLVYGLVDGLVTFYLPLLVMCI
U25440 VISITLSFLSIHLGWN---SRNETSKDNDTIVKCK-----VQVNEVYGLVDGLVTFYLPLLIMCI
S57565 VISITLSFLSIHLGWN---SRNGTRGGN-DTFKCK-----VQVNEVYGLVDGLVTFYLPLLIMCV
S73473 IVSATVSFAPIMSQWWRVGADAEAEQCHSNPRCCS-----FASNMPYALLSSSVSFYLPLLVMLF
M74716 IVSATVSFAPIMSQWWRVGADAEAEQCHSNPRCCS-----FASNMPYALLSSSVSFYLPLLVMLF
U64032 AVALVVS-MGP LLGWK-----EPVPPD--ERFC-----GITEEVGYAVFSSLCSFYLPMAVIVV
L41147 SLAALASFLPLLLGWH-----ELGHARPPVPGQC-----RLLASLPFVLVASGLTFFLPSPAICF
GPRv47 VKALAMASVPVLGRVS--WEEGAPSVPPG-----CSLQWSHSAYCQLFVVVFAVLYFLLPLLLILV
D43633 FKSLLLA-LVT LFGWPPYGHQSSI AASH-----CSLHASHSRLRGVFAVLFVCICFLAPVVVIFS
: : : * : : * * :

#
HSH2R_1 TYRIFRVARQAKRID-HIS-----SWKAATIR-----
D49783 TYRIFKVARQAKRIN-HIS-----SWKAATIR-----
M32701 TYRIFKVARQAKRIH-HMG-----SWKAATIG-----
U25440 TYRIFKVARQARRIN-HIG-----SWKAATIR-----
S57565 TYRIFKVARQAKRIN-HIS-----SWKAATIR-----
S73473 VYARVFFVAKRQRRLLRRELGRFPPEESPRSPSRSPATVGTPTAS-----DGPVSCGR
M74716 VYARVFFVAKRQRRFVRRELGRFPPEESPRSPSRSPATVGTPTAS-----DGPVSCGR
U64032 MYCRVYVVARSTTRSLEAGVKRERKASEVVLRIHCRGAASGADGAPGTRGAKGHTFRSS
L41147 TYCRILLAARKQAVQVASLTG-----MASQASETLQVPRTP--R--PGVESADS
GPRv47 VYCSMFRVARVAAMQHGPLPTWMETP-----RQRSELSR--S-----TMVTSSGA
D43633 VYSAVYKVARSAALQQVPAVPTWADAS-----PAKDRSDSINSQTT-----IITRTL
* : * :

##### TM6 #####
HSH2R_1 -----EHRATVTLAAVMGAFIICWFPHYTAFFVYRGLRGDDAINEMLEAIVLWLGY
D49783 -----EHKATVTLAAVMGAFIICWFPHYTAFFVYRGLRGDDAINEVLEAIVLWLGY
M32701 -----EHKATVTLAAVMGAFIICWFPHYTFVYRGLRGDDAINEAFEAVVLWLGY
U25440 -----EHKATVTLAAVMGAFIICWFPHYTFVYRGLRGDDAVNEVFEDVVLWLGY
S57565 -----EHKATVTLAAVMGAFIICWFPHYTAFFVYRGLRGDDAINEAVEGIVLWLGY
S73473 RPARLLPLG-EHRALRTLGLIMGIFSLCWLPPFLANVLRALVGPLVPSGVFIALNWLGY
M74716 RPARLLPLG-EHRALRTLGLIMGIFSLCWLPPFLANVLRALVGPLVPSGVFIALNWLGY
U64032 LSVRLLKFSREKKAATLAIIVGVFVLCWFPFFVPLGLSLFPQLKPSSEGVFKVIFWLGY
L41147 RRLATKHSRKALKASLTGLIGLGMFFVTWLPFFVANIVQAVC--DCISPLGFDVLTWLGY
GPRv47 PQTTPHRTFGGGAHVLLAVGGFLLCWLPHYFSHLYVALSAQPISTGQVESVVTWIGY
D43633 QRLSPERAFSGGKAALTAFIVGQFLVCWLPPFIHFLQMSLTGSMKSPGDLEEAVNWLAY
: * : * : * : * : * : * : * :

TM7 #####
HSH2R_1 ANSALNPILYAALNRDFRTGYQQLFCCRLANRNSHKTSLRSNASQLSRTQSREPR----Q
D49783 ANSALNPILYAALNRDFRTGYQQLFCCRLANRNSHKTSLRSNASQLSRTQSREPR----Q
M32701 ANSALNPILYATLNRDFRTAYQQLFRCRPAASHNAQETSLRSNSSQLARNQSREPM----R
U25440 ANSALNPILYAALNRDFRTAYHQLFCCRLASHNSHETSLRLNNSQLNRSQCQEPR----W
S57565 ANSALNPILYAALNRDFRTAYQQLFHCKFASHNSHKTSLRLNNSLLPRSQSREGR----W
S73473 ANSAFNPLIYCR-SPDFRDAFRLL--CSYGGRGPEEP--RVVTFPASPVASR-----
M74716 ANSAFNPLIYCR-SPDFRDAFRLL--CSYGGRGPEEP--RVVTFPASPVASR-----
U64032 FNSCVNPLIYPCSSREFKRAFLRLRCQCRRRRRRPLWRVYGHWRASAGGGPHPCAL
L41147 CNSTMNPIIYPLFMRD FKRALGRFLPCPRCPRERQAS-LASPSLRTSHSGPRPGLS---L
GPRv47 FCFTSNPFFYGCLNRQIRGELSKQFVCFKPAPEEELRLPSREGSIEENFLQ-----F
D43633 SSFAVNPSFYGLLNRIIDELVKFRCCVTQVPEIGP--SSLEGSFQENFLQ-----F
* * : * : * : * :

```

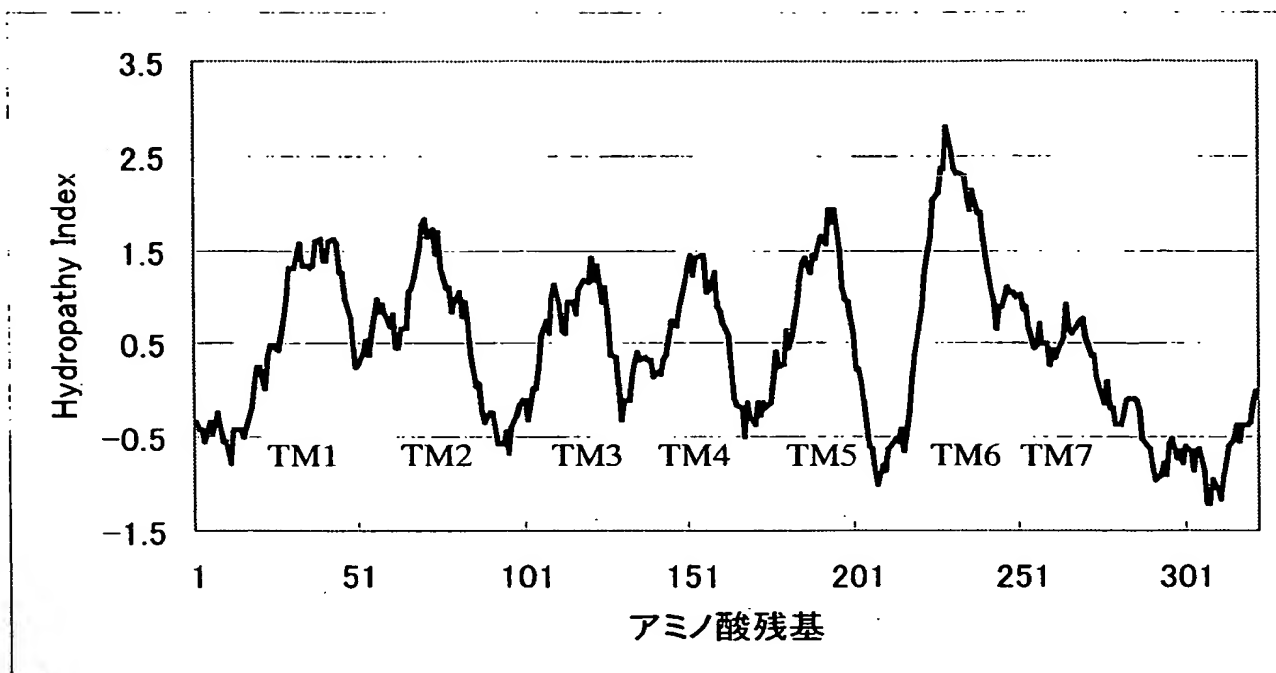
25 / 34

☒ 25

HSH2R_1	QEEKPLKLQVWSGTEVT-----
D49783	QEEKPLKLQVWSGTEVTAPQGATDR-----
M32701	QEEKPLKLQVWSGTEVTAPRGATDR-----
U25440	QEDKPLNLQVWSGTEVTAPQGATNR-----
S57565	QEEKPLKLQVWSGTELTHPQGNPIR-----
S73473	QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT-----
M74716	QNS-PLNR--FDGYEGERP-FPT-----
U64032	SAGAALPGAALALTAAPAPSSAAAPGQAAGAGRRKPPCAFREWRLGPLRRPTTQLRAK
L41147	QQVLPLPLPPDSDDSDAGSGSSGLRLTAQLLLPGEATQDPPLPTRAAA AVNFFNIDPA
GPRv47	LQGTGCPSESWVSRPLSPKQEPVDFRIPGQIAEETSEFLEQQLTSDIIMSDSYLRPA
D43633	IQRTSSSSETHPSFANSNP-RNMENQAHKIPGQIPPEQA-----
HSH2R_1	-----
D49783	-----
M32701	-----
U25440	-----
S57565	-----
S73473	-----
M74716	-----
U64032	VSSLSHKIRAGGAQRAEAACALRSEVEAVALSVARDVAEDNTCQAYELADYRNLRETDI
L41147	EPELRPHPLGIPTN-----
GPRv47	ASPRLES-----
D43633	-----

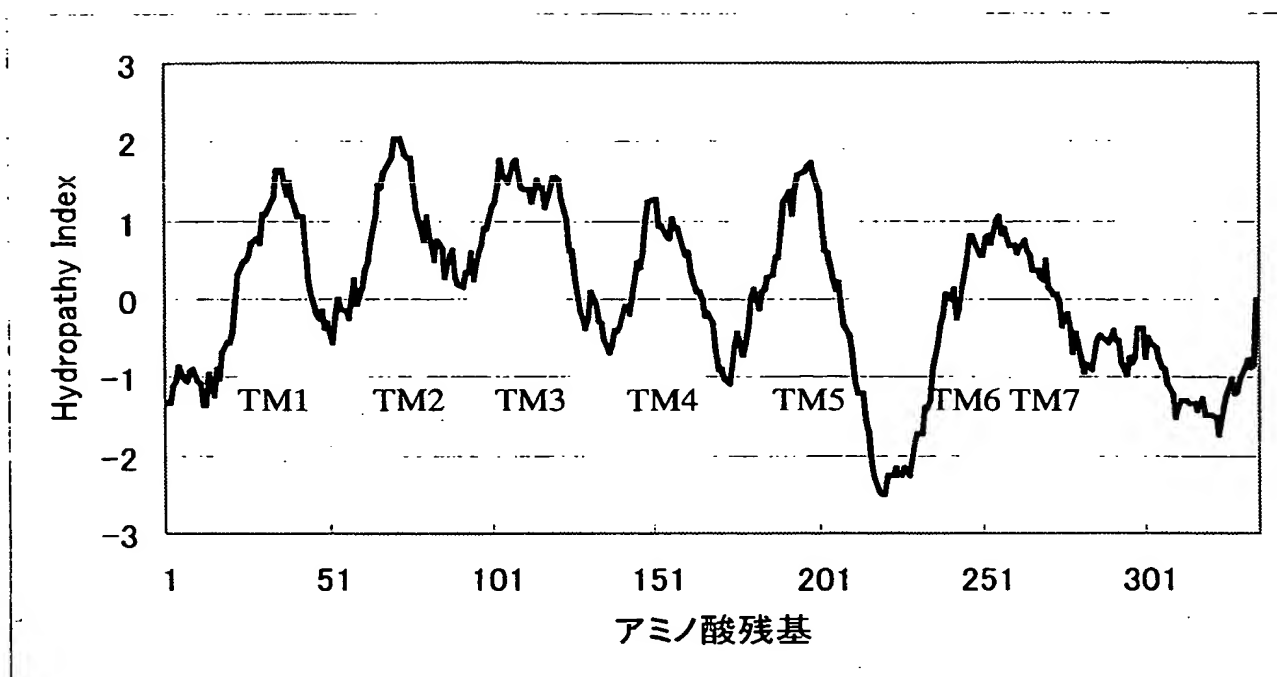
26/34

図 26



28 / 34

図 28



29 / 34

☒ 29

```

                                ##### TM1 ##
Y14705 -----MTSAESLLFTSLGSPSSSGDGRFNEEFKILLPMSYAVVFLGLAL
AJ277752 -----MTSADSLFTSLGSPSSSGDGRFNEEFKILLPLSYAVVFLGLAL
AF031897 --MDAPVRMFSLAPWTPTPTPLWLGNTTAAAEAKCVFNEEFKILLPISYGI VVVGLPL
X99953 MTEDIMATSYPTFLTTPYLPKLLMNLNDTEDICVFDEGFKFLLLPVSYSAVFMVGLPL
AF069555 -----MSMANFTA---GR-----NSCTFQEEFKQVLLPLVYSVVFLGLPL
X98283 -----MSMANFTG---GR-----NSCTFHEEFKQVLLPLVYSVVFLGLPL
D63665 -----MERDNGTIQAPGLPP---TTCVYREDFKRLLLPPVYSVVLVVGLPL
GPRv71 -----MEKVDMNTSQ--EQ-----GLCQFSEKYKQVYLSLAYSIIIFILGLPL
                                * : * : * : * . : : : * . *

##### TM2 #####
Y14705 NAPTLWLFLFRLRPWDATATYMFHLALSDTLVLSLPTLVYYYAARNHWPFGTGLCKFVR
AJ277752 NAPTLWLFLFRLRPWDATATYMFHLALSDTLVLSLPTLVYYYAARNHWPFGTGFCFVR
AF031897 NSWAMWIFVSRMRPNWATTTYMFNLALSDTLVFSLPTLVYYYADRNNWPFGKVFCIVR
X99953 NIAAMWIFI AKMRPNWPTTVYMFNLALSDTLVLSLPTLVYYYADKNNWPFGVLCCLVR
AF069555 NAVVIGQIWLARKALTRTTIYMLNLATADLLYVCSLPLLIYNYTQKDYWPFGDFTCKFVR
X98283 NAVVIGQIWLARKALTRTTIYMLNLAMADLLYVCSLPLLIYNYTQKDYWPFGDFTCKFVR
D63665 NVCVIAQICASRRTLRSAYVTNLALADLLYACSLPLLIYNYARGDHWPFGLACRLVR
GPRv71 NGTVLWHFWGQTKRWSCATTYLVNLMVADLLYVL-LPFLIITYSLDDRWPFGELLCKLVH
* . : : : : : * . * : * * . * * : * : : * * * * : : :

##### TM3 #####
Y14705 FLFYWNLYCSVLFLTCISVHRYLGICHPLRAIRWGRPR-FASLLCLGVWLVVAGCLVPNL
AJ277752 FLFYWNLYCSVLFLTCISVHRYMGICHPLRAIRWGRPR-FAGLLCLGVWLVVAGCLVPNL
AF031897 FLFYANLYSSILFLTCISVHRYMGICHPIRSLKWKTK-HARLICVGVWLVVTICLIPNL
X99953 FLFYANLYSSILFLTCISVHRYRGVCHPITSLRRMNAK-HAYVICALVWLSVTLCLVPNL
AF069555 FQFYTNLHGSILFLTCISVQRYMGICHPLASWHKKKGKKTWLVCAAVWFIVIAQCLPTF
X98283 FQFYTNLHGSILFLTCISVQRYMGICHPLASWHKKKGKKTWLVCAAVWFIVIAQCLPTF
D63665 FLFYANLHGSILFLTCISFQRYLGICHPLAPWHKRGRRAAWVCGVWLVVTAQCLPTA
GPRv71 FLFYINLYGSILLTLCISVHQFLGVCHPLCSLPYRTRR-HAWLGTSTTVALVVLQLLPTL
* * * * : * : * * * : : : * * : * .

##### TM4 #####
Y14705 FFVTTNANGTTILCHDTTLPEEFDHVYVYFSSAVMVLLFGLPFLITLVCYGLMARRLYRPL
AJ277752 FFVTTNANGTTILCHDTTLPEEFDHVYVYFSSIMVLLFGFPFLITLVCYGLMARRLYRPL
AF031897 IFVTTSSKONSTLCHDTTKPEEFDHVYVYSSIMALLFGIPFLVIVVCYCLMAKRLCKRS
X99953 IFVTVSPKVNTICHDTTRPEDFARYVEYSTAIMCLLFGIPCLIIAGCYGLMTRMLKPI
AF069555 VFASTGTQRNRTVCYDLSPPDRSASYFPYGITLTITGFLLPFAAILACYCSMARILCQKD
X98283 VFASTGTQRNRTVCYDLSPPDRSTSYFPYGITLTITGFLLPFAAILACYCSMARILCQKD
D63665 VFAATGIQRNRTVCYDLSPPILSTRYPYGMALTIVIGFLLPFTALLACYCRMARRLCRQD
GPRv71 AFSHTDYINGQMIWYDMSQENFDRLFAYGIVLTLSGFLSLLGHFGVLFDTGQEPDQARG
* . . : : * : . . : * : . .

##### TM5 #####
Y14705 PGAGQS---SSRLRSLRTIAVVLTVFAVCFVPFHI TRTIYYQAR-LLQADCHVLNIVNVV
AJ277752 PGAGQS---SSRLRSLRTIAVVLTVFAVCFVPFHI TRTIYYLAR-LLNAECRVNIVNVV
AF031897 FPSPSPRVPSYKKRSIKMIIIVLTVFAICFVPFHI TRTLYYTSR-YFQADCQTLNIIIFT
X99953 VSGNQQTLPYKKRSIKTIIFVMIAFAICFMPFHI TRTLYYAR-LLGIKCYALNIVNVT
AF069555 ELIGLAVH-KKKDKAVRMIIIVVIVFSISFFPFHLTKIYLI VRSSPTLPCPTLQAFAlA
X98283 ELIGLAVH-KKKDKAVRMIIIVVIVFSISFFPFHLTKIYLI VRSSASLPCPTLQAFAlA
D63665 GPAGPVAQ-ERRSKAARMVAVVAVFVIFSLPFHITKTAYLAVRSTPGVSCPVLFTFAAA
GPRv71 EPHEDRQHSPSQVHPDHTGVWPLHPLFCALPYHSLLLPHHLLSAFSGLPALDGSQCGLQ
                                : . . : . . * : * : .

```

30 / 34

☒ 30

TM7 #####
Y14705 YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGSK--PKPR-----TAASSL
AJ277752 YKVTRPLASANSCLDPVLYLFTGDKYRNQLQQLCRGST--PKRR-----TTASSL
AF031897 YK ITRPLASINSCLDPILYFMAGDKYRGRLRRGAAQR--P-R-----PVPTSL
X99953 YKVTRPLASANSCLDPILYFLANDRYRRRLIRTVRRRSSVPNRRCMHTNHPQTEPHMTAG
AF069555 YKCTRPFASMNSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRHD
X98283 YKCTRPFASMNSVLDPILFYFTQRKFRESTRYLLDKMS-----SKWRQD
D63665 YKGTRPFASANSVLDPILFYFTQQKFRRQPHDLLQKLT-----AKWQRQ
GPRv71 DMEASGECEQLPQPSPVLSFKGGKNRVRLQKLRQNKLG-----EHPAGRK

: : * : *

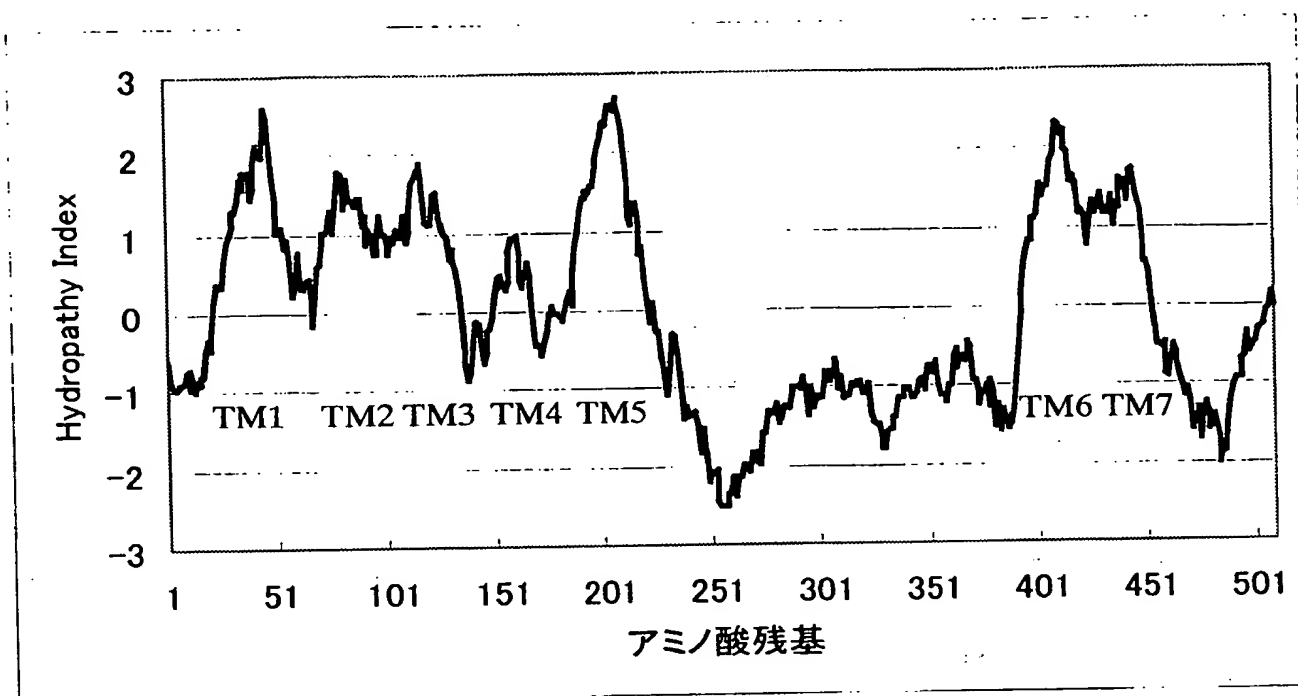
Y14705 ALVTLHEESISRWADTHQDSTFSAYEGDRL-----
AJ277752 ALVTLHEESISRWADIHQDSIFPAYEGDRL-----
AF031897 LALVSPSVDSSVVGSCCNSE---SRGMGTVWSRGGQ-----
X99953 PLPVISAEIIPSN GSMVRDENGEGSREHRVEWTDKEINQMMNRRSTIKRNSTDKNDMKE
AF069555 HCITYGS-----
X98283 HCISYGS-----
D63665 RV-----
GPRv71 RCPGLNRSG-----

Y14705 -----
AJ277752 -----
AF031897 -----
X99953 NRHGENYLPYVEVVEKEDYETKRENKKTTEQSSKTNAEQDELQTQIDSR LKRGKWQLSSK
AF069555 -----
X98283 -----
D63665 -----
GPRv71 -----

Y14705 -----
AJ277752 -----
AF031897 -----
X99953 KGAAQENEGKHMEPSFEGEGTSTWNL LTPKMYGKKDRLAKNVEEVGYGKEKELQNFPA
AF069555 -----
X98283 -----
D63665 -----
GPRv71 -----

31/34

図 31



$3\ 2 / 3\ 4$

图 3 2

```

##### TM1 #####
U03866 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
L31774 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
D25235 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
D32202 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
D32201 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
AF013261 -----MVFLSGNAS--DSSNCTQPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
U81982 -----MVFLSGNAS--DSSNCTHPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
U07126 -----MVLLSENAS--EGSNCTHPPAP-----VNISKAILLGVILGGLILFGVLGNILV
S71323 MVPVLDNMT PSSVTL--NCSNCSHVLAP-----LNTVKAVVLGMVLGIFILFGVIGNILV
D63859 -----MTPSSVTL--NCSNCSHVLAP-----LNTVKAVVLGMVLGIFILFGVIGNILV
AF091890 -----MSLNSSLSCRKELSNLTEEGG-----EGGVIITQFIAIIVITIFVCLGNLVI
GPRv72 -----MTSTCTNST--RESNSSHTCMLSKMPI SLAHGIIRSTVLVIFLAASFVGNIVL

```

```

###          ##### TM2 #####          @#####
U03866      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
L31774      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
D25235      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
D32202      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
D32201      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
AF013261    ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEVLGYWAFGRVFCNIWAAVDV
U81982      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEILGYWAFGRVFCNIWAAVDV
U07126      ILSVACHRHLHSVTHYYIVNLAVADLLLLTSTVLPFSAIFEILGYWAFGRVFCNIWAAVDV
S71323      ILSVVCHRHLQTVTTYFIVNLAVADLLLSSTVLPFSAIFEILDRWVFGRVFCNIWAAVDV
D63859      ILSVVCHRHLQTVTTYFIVNLAVADLLLSSTVLPFSAIFEILDRWVFGRVFCNIWAAVDV
AF091890    VVTLYKKS YLLTLSNKFVFSLTLSNFLSVLVLFPFVVTSSIRREWIFGVVWCNFSALLYL
GPRv72      ALVLQRKPQLLQVTNRFENLLVTDLLQISLVAPWVYVATSVPLFWPLNSHECTALVSLTH

```

```

# TM3 ##### TM4 #####
U03866 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
L31774 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
D25235 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
D32202 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
D32201 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
AF013261 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLMALLCVWALS LVI SIGPLFGWR-
U81982 LCCTASI I SLCVISIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGLRALLCVWAFSLV I SVGPLFGWR-
U07126 LCCTASIMGLCII SIDRYIGVSYPLRYPTIVTQRRGVRALLCVWVLSLV I SIGPLFGWR-
S71323 LCCTASIMSLCVISVDRYIGVSYPLRYPAIMTKRRALLAVMLLWVLSV I I SIGPLFGWK-
D63859 LCCTASIMSLCVISVDRYIGVSYPLRYPAIMTKRRALLAVMLLWVLSV I I SIGPLFGWK-
AF091890 LISSASMLTLGVIAIDRYYAVLYPMVYPMKITGNRAVMALVYIWLHSLIGCLPPLFGWSS
GPRv72 LFAFASVNTIVVVSVDRLSI I HPLSYPSKMTQRRGYLLLYGTWIVAILQSTPPLYGWGQ
* . ** : : : : : *** : : * : ** * : * : * : : : : ** : **

```

3 3 / 3 4

☒ 3 3

```

##          @          ##### TM5 #####
U03866      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
L31774      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
D25235      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
D32202      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
D32201      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
AF013261    QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFY LPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
U81982      QPAPDEETICQINE--EPGYVLFSA LGSFYVPLTII LAMYCRVYVVA KRESRGLK----S
U07126      QPAPEDETICQINE--EPGYVLFSA LGSFYVPLAI ILVMYCRVYVVA KRESRGLK----S
S71323      EPAPEDETVCKITE--EPGYAIFSA VGSFY LPLAI ILAMYCRVYVVA QKESRGLK----E
D63859      EPAPEDETVCKITE--EPGYAIFSA VGSFY LPLAI ILAMYCRVYVVA QKESRGLK----E
AF091890    VEFDEFKWMCVAAWHREPGYTA FWQIWCALFPFLVMLVCYGFIFRVARVKARKVH----C
GPRv72      AAFDERNALCSMIWGASPSYTI LSVVSFIVIP LVM IACYSVVFCAARRQHALLYNVKRH
              : : : * . * . : : . * : : : * : : . * : : :

#####
U03866      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
L31774      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
D25235      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
D32202      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
D32201      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
AF013261    GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGMASAKTKTHFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
U81982      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNAPAGGSGVASAKNKT HFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
U07126      GLKTDKSDSEQVTLRIHRKNVPAEGGGVSSAKNKT HFSVRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
S71323      GQKIEKSDSEQVILRMHRGN TTVSED--EALRSRTHFALRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
D63859      GQKIEKSDSEQVILRMHRGN TTVSED--EALRSRTHFALRLLKFSREKKA AKTLGIVVG-
AF091890    GTVVIVEEDAQRTG---RKNSS TSTS--SSGSRRAFQGVVYSANQCK-ALITILVVLG-
GPRv72      SLEVRVKDCVENEDEEGA EKKEEFQD--ESEFRRQHEGEVKAKEGRMEAKDGS LKAKEGS
              . : : : : : : : : : : : : : *

##### TM6 ##### TM7
U03866      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
L31774      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
D25235      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
D32202      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
D32201      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
AF013261    ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
U81982      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPPETVFKIVFWLG YLNSCIN----
U07126      ----CFVLCWLP----FFLVMPIGSFFPD----FKPSETVFKIVFWLG YLNSCIN----
S71323      ----CFVLCWLP----FFLVLPIGSIFPA---YRPSDTVFKITFWLG YFN SCIN----
D63859      ----CFVLCWLP----FFLVLPIGSIFPA---YRPSDTVFKITFWLG YFN SCIN----
AF091890    ----AFMVTWGP----YMVVIA SEALWGK---SSVSPSLETWATWLSFASAVCH----
GPRv72      TGTSESSVEARGSEEVR ESSTVASDGSMEGKEGSTKVEENSMKADKGRTEVNQCSIDLGE
              . : . * . : . . .

```


INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705,
C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00,
G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/09, C07K14/705

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 8-245697, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 24 September, 1996 (24.09.96) (Family: none)	1-15, 17
A	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 22 January, 1998 (22.01.98) & AU, 9869736, A & US, 5891720, A & EP, 1007536, A1	1-15, 17
A	WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC), 29 July, 1999 (29.07.99) & US, 5945307, A & AU, 9922369, A & EP, 1056777, A1	1-15, 17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 March, 2001 (27.03.01)Date of mailing of the international search report
10 April, 2001 (10.04.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09408

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 16 pertains to methods for diagnosis of diseases and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 15 and 17 are divided into groups of 9 individual inventions, i.e., inventions relating to DNAs encoding the amino acids of SEQ ID NOS:1 to 4 and 17 to 21, and DNAs having the sequences of SEQ ID NOS:5 to 8 and 22 to 26. These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1 to 15 and 17 (inventions relating to the DNA encoding the amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and the DNA having the sequence of SEQ ID NO:5)

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C07K14/705, C07K16/28, C12P21/02, C12Q1/02, C12Q1/68, A61K31/711, A61K48/00, A61P43/00, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00~15/09, C07K14/705

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GeneBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 8-245697, A (武田薬品工業株式会社) 24. 9月. 1996 (24. 09. 96) (ファミリーなし)	1-15, 17
A	WO, 98/46620, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 22. 1月. 1998 (22. 01. 98) &AU, 9869736, A&US, 5891720, A&EP, 1007536, A1	1-15, 17
A	WO, 99/37679, A1 (MILLENNIUM PHARM INC) 29. 7月. 1999 (29. 07. 99) &US, 5945307, A&AU, 9922369, A&EP, 1056777, A1	1-15, 17

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 03. 01

国際調査報告の発送日

1 0.04.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 16 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 16 の発明は、疾病の診断方法に該当し、特許協力条約第 17 条 (2)
(a) (i) 及び特許協力条約に基づく規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査
機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしてい
ない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に
従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-15, 17 に記載された発明は、配列番号 1-4, 17-21 のアミノ酸配列をコードする DNA、または配列番号 5-8, 22-26 の配列を有する DNA に係る発明群という、個々の 9 の発明に区分され、当該発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは、認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 1－15, 17 (配列番号 1 のアミノ酸配列をコードする DNA、及び配列番号 5 の配列を有する DNA に係る部分の発明)

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。